

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ВАРНА
«ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ»
катедра „Физиология и патофизиология”

д-р БОРЯНА КРУМОВА РУСЕВА

СЕЛЕН И ФУНКЦИОНАЛНО СЪСТОЯНИЕ
НА СЪДОВАТА СТЕНА ПРИ НОРМО- И
ХИПЕРТЕНЗИЯ
- ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОУЧВАНИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
по научната специалност
„Физиология на животните и човека” (01.06.17)



Варна
2012 г.

Дисертационният труд съдържа 153 стандартни машинописни страници, 13 таблици и 56 фигури.

Цитирани са 262 заглавия, от които 11 на кирилица и 251 на латиница.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита пред научно жури на разширено заседание на катедрения съвет на катедра „Физиология и патофизиология” при МУ – Варна.

Публичната защита ще се проведе нав МУ – Варна.

Материалите по защитата са публикувани на сайта на МУ – Варна. Печатен вариант е на разположение на интересуващите се в катедра „Физиология и патофизиология” при МУ – Варна, ул. „Проф. Марин Дринов” 55, IV^{ти} етаж.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ВАРНА
«ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ»

д-р БОРЯНА КРУМОВА РУСЕВА

**СЕЛЕН И ФУНКЦИОНАЛНО СЪСТОЯНИЕ
НА СЪДОВАТА СТЕНА ПРИ НОРМО- И
ХИПЕРТЕНЗИЯ
- ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОУЧВАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

**за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
по научната специалност
„Физиология на животните и човека” (01.06.17)**

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

доц. д-р Марийка Георгиева, д.м.
проф. Фани Рибарова, д.б.

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ:

проф. д-р Тодор Ганчев, д.м.н.
доц. д-р Денко Страшимиров, д.м.

Варна - 2012 г.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

КИРИЛИЦА

AP	Артериална ригидност
AX	Артериална хипертензия
CAH	Систолочно артериално налягане
CЗО	Световна здравна организация
ССЗ	Сърдечно-съдови заболявания

ЛАТИНИЦА

AE abs	Анти – еластинови антитела
AGEs	Продукти на късното гликиране
Ang II	Ангиотензин II
anti- AGE abs	Антитела срещу продуктите на късното гликиране
ATE abs	Анти – тропоеластинови антитела
CHOL	Общ холестерол
ECM	Екстрацелуларен матрикс
GPx	Глутатион пероксидаза
GRD	Глутатион редуктаза
Hb	Хемоглобин
HE	Хематоксилин еозин
eNOS (NOS 3)	Ендотелна азотнооксидна синтаза
HDL	Липопротеини с висока плътност
H ₂ O ₂	Водороден пероксид
IgG	Имуноглобулин Г
iNOS (NOS2)	Индуцируема азотнооксидна синтаза
КЕДТА	Калиев етилен диамин тетра-ацетат
LDL	Липопротеини с ниска плътност
Li	Литий
mRNA	Матрична рибонуклеинова киселина
NAD(P)H	Никотин-аденин-динуклеотид (фосфат)
nNOS (NOS1)	Невронална азотнооксидна синтаза
NO	Азотен оксид
NOS	Азотнооксидна синтаза
ROOH	Липидни хидропероксиди
ROS	Реактивни форми на кислорода
SD	Стандартното отклонение
Se	Селен
Sec	Селеноцистеин
Sel	Селенопротеин
SEM	Стандартна грешка на средната
SHR	Спонтанно хипертензивни плъхове
SOD	Супероксид дисмутази
tRNA	Транскрипционна рибонуклеинова киселина
VCAM-1	Съдово-клетъчна адхезивна молекула
WHO	Световна здравна организация
(X)	Средна стойност на изследваната величина

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	ВЪВЕДЕНИЕ	6
II.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
III.	МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	8
1.	Експериментален протокол	8
1.1	Опитни животни	8
1.2	Групи	8
2.	Състав на диетите с различно селеново съдържание	8
3.	Измерване на систоличното кръвно налягане	9
4.	Вземане на кръв за изследване	9
5.	Определяне серумна концентрация на селен	9
6.	Определяне на липидни хидропероксиди в серум	9
7.	Хематологични изследвания	10
8.	Определяне активността на GPx-1 в цялостна кръв	10
9.	Хистологични изследвания	10
10.	Електронно-микроскопски изследвания	10
11.	Определяне експресията на ензима GPx-1 в аорта и миокард	10
12.	Определяне експресията на ензима eNOS-3 в аорта и миокард	11
13.	Биохимични методи	11
14.	Имунологични методи	11
15.	Статистически методи	12
IV.	РЕЗУЛТАТИ	13
	<i>A. Резултати при WKY SHR плъхове, третирани с различни селенови диети в пубертетен период</i>	
1.	Телесна маса	13
2.	Систолично артериално налягане	13
3.	Серумна концентрация на селен	14
4.	Състояние на оксидативния баланс	15
4.1	Ниво на липидна пероксидация	15
4.2	Активност на GPx-1 в цялостна кръв	16
4.3	Експресия на GPx-1 в аортна стена и миокард	16
4.4	Експресията на eNOS-3 в аортна стена и миокард	20
5.	Липиден профил	21
6.	Определяне дебелина на аортна стена	22
7.	Електронно-микроскопско изследване на аортна стена	24
8.	Имунологични изследвания	25
	<i>B. Резултати при WKY SHR плъхове, третирани с различни селенови диети в период на зрялост</i>	
1.	Телесна маса	29
2.	Систолично артериално налягане	29
3.	Серумна концентрация на селен	29
4.	Състояние на оксидативния баланс	30
4.1	Ниво на липидна пероксидация	30
4.2	Активност на GPx-1 в цялостна кръв	31
4.3	Експресия на GPx-1 в аортна стена и миокард	32
4.4	Експресията на eNOS-3 в аортна стена и миокард	35
5.	Липиден профил	35
6.	Хистологични промени и определяне дебелина на аортна стена и коронарии	36
7.	Електронно-микроскопско изследване на аортна стена	39
8.	Имунологични изследвания	44
V.	ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ	45
VI.	ИЗВОДИ	60
VII.	ПРЕПОРЪКИ	61
VIII.	ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	62
IX.	СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	63
X.	SUMMARY	65

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Функционалното състояние на сърдечно-съдовата система е подложено на прецизен контрол, в който вземат участие множество нервни и хуморални механизми. Поради комплексни причини от промени във факторите на околната среда и генетична предиспозиция, с напредване на възрастта може да настъпят промени в съдова стена и миокард, водещи до болестни процеси.

Оксидативният стрес, т.е. дисбалансът между прооксидантите и антиоксидантите е основен патогенетичен механизъм при много заболявания: сърдечно-съдови, възпалителни, автоимунни, дегенеративни и неопластични.

Селенът (Se) е есенциален микроелемент, осъществяващ биологичното си действие най-вече като кофактор на ензимите: глутатион пероксидази (GPx), тиоредуксин редуктази, йодтиронин дейодинази. Експресията на селенопротеините в тъканите е в пряка връзка със селеновия прием. Значението на селена за живия организъм е свързано с функцията на тези ензими: участие в антиоксидантната защита, в редокс-системи и в метаболизма на щитовидните хормони.

Селеновата суплементация се прилага успешно при лечението на някои възпалителни, автоимунни, дегенеративни и неопластични заболявания. Все още не са достатъчно документирани ползите от прилагането ѝ при сърдечно-съдови заболявания. Дискутабилни са и данните от прилагането на селенова суплементация за превенция на тези заболявания.

Възникването на ендотелна дисфункция при оксидативен стрес е основно патогенетично звено в началните стадии на артериалната хипертензия и атеросклерозата. Вероятността за възникване на патологични промени в съдовата стена поради недостиг на селен е реална, което налага детайлно проучване на влиянието на различния селенов прием върху функционалното ѝ състояние при нормо- и хипертензия.

През последните години се наблюдава значителна промяна в модела на заболяемостта в света. Вече съществува „епидемия“ от неинфекциозни заболявания: сърдечно-съдови болести (коронарна болест на сърцето, хипертонична болест, мозъчно-съдова болест), ракови заболявания, диабет, затлъстяване и др., в патогенезата на които важен фактор е повишеният оксидативен стрес. Съгласно данни на СЗО, 60% от смъртността в световен

мащаб се дължи на тези заболявания, като се очаква през 2020 год. тя да достигне 73% (WHO, 2003). Ето защо при търсенето на благоприятни хранителни модуляции върху антиоксидантната защита на организма, би било полезно да се разширят проучванията за ролята на селена върху функционалното състояние на съдовата стена в здраве и болест.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ: Да се проучат ефектите на различното селеново съдържание в храната върху оксидативния статус и неговото отражение върху липидния профил и съдовата стена у нормотензивни Wistar-Kyoto (WKY) и спонтанно-хипертензивни плъхове (SHR).

ЗАДАЧИ:

1. Да се създадат модели на селенов дефицит и излишък у плъхове WKY и SHR.

2. Да се изследва състоянието на оксидативния баланс у плъхове WKY и SHR на диета с недостиг и излишък на селен чрез:

- отчитане серумното ниво на липидни хидропероксиди
- измерване активността на GPx-1 в цялостна кръв
- проследяване експресията на GPx-1 и eNOS-3 в миокард и съдова стена.

3. В условията на моделираните дисселенози (хипо- и хипер-) да се отчетат и анализират взаимоотношенията между оксидативния статус, артериалното налягане, липидния профил и показатели, отразяващи състоянието на съдовата стена при плъхове WKY и SHR:

- хистологични и електронно-микроскопски изследвания
- серумно ниво на антитела срещу продуктите на късното гликиране
- серумно ниво на анти-еластинови и анти-тропоеластинови антитела

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Експериментален протокол

1.1 Опитни животни

Изследвани са 168 мъжки плъха: 84 Wistar-Kyoto и 84 SHR (Okamoto-Aoki) на 4 и 8 месечна възраст, родени и отглеждани във Вивариума на МУ-Плевен, в съответствие с изискванията на нормативните документи за защита и хуманно отношение към лабораторните животни.

1.2. Групи

Животните бяха разпределени в 12 групи, според възрастта и състава на прилаганата диета с различно селеново съдържание, представени в Таблица 1.

Диети	Wistar-Kyoto – възраст	брой	SHR – възраст	брой
0,05µg Se/g фураж (L Se)	Група 1 – 4 мес.	16	Група 4 – 4 мес.	16
0,11µg Se/g фураж (N Se)	Група 2* – 4 мес.	16	Група 5* – 4 мес.	18
0,25µg Se/g фураж (H Se)	Група 3 – 4 мес.	18	Група 6 – 4 мес.	18
0,05µg Se/g фураж (L Se)	Група 7 – 8 мес.	12	Група 10 – 8 мес.	10
0,11µg Se/g фураж (N Se)	Група 8* – 8 мес.	10	Група 11* – 8 мес.	10
0,25µg Se/g фураж (H Se)	Група 9 – 8 мес.	12	Група 12 – 8 мес.	12

Таблица 1. Групи опитни животни , използвани при изследването.

Обозначените със звездичка групи са контроли за различните възрастови периоди при двете породи плъхове.

2. Състав на диетите с различно селеново съдържание

Установено е, че диета, съдържаща 0,1 µg Se/g храна е достатъчна за нормален растеж и репродукция при всички видове бозайници (WHO, 1996). Academy of Sciences USA, Nutrient Requirements of Laboratory Animals Forth Revised Edition (1995г.) определя, че за поддържане на оптимално развитие у плъхове е необходимо диетата да съдържа 150 µg Se/kg храна (0,15 µg Se/g). Концентрация от 250 µg Se/kg диета (0,25 µg Se/g) като селенометионин води до максимална активност на GPx в тъканите, поради което селенът в диетата при изследването е представен под формата на селенометионин. Ръководейки се от литературните данни, използвахме 3

диети: диета №1 – с ниско селеново съдържание (0,05 µg Se/g фураж); диета №2 (контролна) – с препоръчително (адекватно) селеново съдържание (0,11 µg Se/g фураж); диета №3 – с високо селеново съдържание (0,25 µg Se/g фураж), произведени от фирма „Бонмикс - ЕООД“, гр. Ловеч.

Диетите са прилагани 8 седмици, след навършване на двумесечна възраст за плъхове от 1^{ва} до 6^{та} групи и след навършване на 6 месечна възраст за животните от 7^{ма} до 12^{та} групи. Животните бяха разделени по 2 броя в касета и оставени на свободен достъп до вода и храна. Количеството изядена храна от плъховете беше отчитано и регистрирано ежедневно. Прилагането на диетите се осъществи след получаване на резултати от анализа на проби от трите вида приготвени храни за съдържание на Se в тях, което отговаряше на заявеното от нас.

Използвани са следните методи на анализ:

1. минерализация на пробите храна за плъхове – извършена по БДС EN 13805:2003 с микровълново разграждане с азотна и солна киселини в лаборатория „Елементен състав“ на НЦООЗ – София;
2. определяне на Se в минерализати чрез атомно-абсорбционен анализ в ЦКЛ на УМБАЛ „Александровска“ ЕАД - София.

3. Измерване на систоличното артериално налягане (САН) на плъховете

Измерване на САН бе извършено в опашката на неанестезиран плъх чрез „tail cuff“ метод и сфигмоманометър (Ugo Basile-58000, Италия) преди и след прилагане на диетите в сектор «Физиология» на МУ - Плевен.

4. Вземане кръв за изследване

След приложената диета и 12 часов период на гладно, сутринта под наркоза с (Pentobarbital sodium 40 mg/kg i.p.) бе взета кръв за изследване от коремната аорта.

5. Определяне серумна концентрация на селен

Изследването беше осъществено чрез директна пламъкова атомно-абсорбционна спектрометрия с апарат „Perkin-Elmer, Model Analyst 300“ в ЦКЛ на УМБАЛ „Александровска“ ЕАД - София.

6. Определяне на липидни хидропероксиди в серум

Концентрацията на липидни хидропероксиди (ROOH) в серума бе определена по метода на K. Yagi (1987), чрез спектрофлуорометричен анализ в лаборатория на сектор «Биофизика» на МУ – Плевен и представена в nmol/ml.

7. Хематологични изследвания

При всички експериментални животни са изследвани: брой еритроцити (RBC) и концентрация на хемоглобин в кръвта (Hb) чрез биоанализатор в МДКЛ на УМБАЛ - Плевен.

8. Определяне активността на GPx-1 в цялостна кръв

Пробите кръв за изследване бяха взети с вакутейнери с литиев хепарин (KABE Labortechnik). Глутатионпероксидазната активност в хепаринизирана цялостна кръв беше определена с реактив "RANSEL" на фирма „Randox Laboratories LTD" по протокол, предоставен от фирмата, базиран на спектрофотометричен метод на Paglia and Valentine с биохимичен анализатор „Hitachi 704" в МДКЛ на УМБАЛ - Плевен. Полученият резултат за активността на GPx-1 U/L цялостна кръв делим на концентрацията на Hb в кръвта (g/L) и получаваме ензимната активност в U/g Hb .

9. Хистологични изследвания

От всички животни бяха екстирпирани сърцата и аортите им по цялата дължина, разделени на две части – торакална и абдоминална. Органите бяха фиксирани в 10% р-р на формалдехид и включени в парафинови блокчета, след напречен срез на сърцето под аурикулата. Изработени бяха надлъжни срези на микротом с дебелина 4µm и оцветени с хемалаун-еозин. Направено бе описание на хистоморфологичните промени чрез светлинна микроскопия. Извършено бе измерване на дебелината на аортната стена и интрамурални дълбоки разклонения на лява коронарна артерия на всяко животно в 10 точки (включващо най-тънкия и най-дебел участъци), използвайки окулярмикрометър. Изготвени бяха фотомикрограми.

10. Електронно-микроскопски изследвания

След фиксиране на взетите проби от органи (миокард и аорта) с глутаралдехид и последващо промиване в какодилатен буфер е направена постфиксация с 2% разтвор на OsO₄ за 2 часа. Включените в дуркопанова смола материали са нарязани на ултрамикротом „LKB", контрастирани с уранил ацетат и оловен цитрат. За отчитане на резултатите и фотографиране е използван електронен микроскоп „Hitachi HS7S". Изследването е извършено в Лаборатория по патоморфология на НЦООЗ - София.

11. Определяне експресията на ензима GPx-1 в аорта и миокард

Изготвени бяха срезове с дебелина 5µm от парафиновите блокчета с включените аорти и миокард и адхезирани на стъкла, на които след

депарафинизиране и хидратиране, бе извършено имунофлуоресцентно определяне експресията на ензима GPx-1 в аортна стена и миокард, използвайки реактиви и следвайки протокола на “Santa Cruz Biotechnology, inc” USA - [home page of Internet]; c2007-08. http://www.scbt.com/protocol_immunofluorescence_cell_staining.html.

Използвахме първично козе поликлонално антитяло (GPx-1 /H-19/ goat polyclonal antibody: sc-22146) и вторично антитяло (конюгирано с флуорохром магарешко анти-козе антитяло IgG - FITC: sc-2024). Резултатите бяха отчетени чрез полуколичествено определяне интензивността на флуоресценция и филмирани чрез флуоресцентен микроскоп (Лазерен скениращ конфокален микроскоп “Leica TCS SPE”, 405 nm възбуждаща дължина на вълната; Acs APO 40,0 x 15; имерсионен обектив) в лаборатория на „Институт по биология и имунология на размножаването” – БАН, София.

12. Определяне експресията на ензима eNOS-3 в аорта и миокард

Подготвени бяха срезове с дебелина 3µm от парафиновите блокчета с включените аорти и миокард и адхезирани на стъкла, на които след депарафинизиране, бе извършено имунохистохимично определяне експресията на eNOS-3 в аортна стена, миокард и коронарии. За целта използвахме, обработка с първично NOS-3 (C-20) заешко поликлонално IgG антитяло и rabbit ABC Staining System с реактиви и по протокол на “Santa Cruz Biotechnology, inc” USA ([home page of Internet]; c. 2007-09. http://www.scbt.com/protocol_immunoperoxidase_cell_staining.html

в имунохистологична лаборатория на катедра „Обща и клинична патология” – МУ-Плевен. Използвайки светлинна микроскопия, бе осъществено полуколичествено отчитане експресията на ензима eNOS-3 според интензивността на оцветяване по следната скала: 0 - липсва, 1 - слабо, 2 - умерено, 3 - силно изразено оцветяване. Изготвени бяха фотомикрограми.

13. Биохимични методи

Определянето на триглицериди, общ холестерол, HDL- и LDL-холестерол в серум бе извършено чрез ензимен колориметричен метод CHOD/ PAB и тестове Cobas Integra на „Roche Diagnostics” в МДКЛ – УМБАЛ – Плевен и получени в mmol/L.

14. Имунологични методи

14.1. Индиректна ELISA за определяне на анти-еластинови и анти-тропоеластинови антитела в плъши серум

Плаки (Microlon U-bottom, high binding, Greiner Bio One, Germany) бяха сенсibiliзирани с 100 μ l плъши белодробен α -elastin за определянето на анти-еластиновите и свински тропоеластин за определяне на анти-тропоеластиновите антитела (Elastin Products Company, USA) (10 μ g/ml). Екстинкциите бяха отчетени от автоматичен микро-ELISA ридер (Ceres UV 900 C, Bio-Tek Instruments Inc.) при 492 nm дължина на вълната.

14.2. Индиректна ELISA за определяне на анти-AGE антитела в плъши серум

Тестирането на всички проби се извърши в 2 етапа:

1. Получаване на късни продукти на гликиране *in vitro* от хемоцианин от мида (Keyhole Limpets, KLH, Sigma) – по H. Nakayama et al., 1989.

2. Индиректна ELISA за определяне на анти-AGE антитела

Полученият гликиран хемоцианин означихме като AGE-KLH и използвахме като антиген за сенсibiliзиране на полистиреновите плаки. След блокиране с 0.1% говежди серумен албумин (BSA; Sigma Aldrich), като първо анти тяло бяха използвани тестираните плъши серуми. Като второ анти тяло беше използван анти-плъши пероксидазен имуноконюгат от клас IgG (Sigma). Екстинкциите на всеки изследван серум бяха отчетени трикратно при 492 nm дължина на вълната, от автоматичен микро-ELISA ридер (Ceres UV 900 C, Bio-Tek Instruments Inc.).

15. Статистически методи

Данните от проучването са обработени със софтуерни статистически пакети Statgraphics v.4.0 и Excel for Windows. Използвани са методи на вариационен, корелационен, дискриптивен и графичен анализи.

Резултатите са описани чрез таблици, графики и числови величини (относителен дял-структура; коефициенти за честота; средни стойности; корелационни коефициенти и др.). Най-често са изразявани като средна стойност на величината (X) \pm стандартно отклонение (SD) и средна стойност (X) \pm стандартна грешка на средната стойност (SEM).

При анализа на резултатите са приложени параметрични тестове за проверка на хипотези чрез t-тест на Student; F-тест на Fisher от Analysis of Variance (ANOVA); Multiple Range Tests за най-малките значими разлики - Least Significant Difference (LSD) при нормално разпределение и непараметрични тестове: χ^2 – тест на Pearson и H-тест на Kruskal-Wallis при различно от нормалното разпределение. Значимостта на изводите и заключенията е определена при $p < 0,05$.

IV. РЕЗУЛТАТИ

A. РЕЗУЛТАТИ ПРИ WKY и SHR ПЛЪХОВЕ, ТРЕТИРАНИ С РАЗЛИЧНИ СЕЛЕНОВИ ДИЕТИ В ПУБЕРТЕТЕН ПЕРИОД

1. Телесна маса

Телесната маса на изследваните животни на двумесечна възраст, при започване на третирането с различни селенови диети беше: $207,68 \pm 7,01$ g за WKY плъхове и $195,89 \pm 6,17$ g за SHR.

При проследяване на телесното тегло за срока на третиране с различните селенови диети прави впечатление, че при WKY плъхове след приложените диети с различно съдържание на Se, групата с ниско селенова диета има значимо по-ниско телесно тегло - $267 \pm 11,95$ g в сравнение с останалите две групи – $277,14 \pm 7,55$ g за 2^{ра} група и $279,77 \pm 9,72$ g за 3^{та} група ($p=0,02$; $F=4,18$).

При SHR обаче теглото на животните със суплементация на Se бе значимо по-високо - $268,89 \pm 20$ g, в сравнение с останалите две групи – $256,67 \pm 19,36$ g за 5^{та} група и $253,25 \pm 14,07$ g за 4^{та} група ($p=0,03$; $F=4,00$).

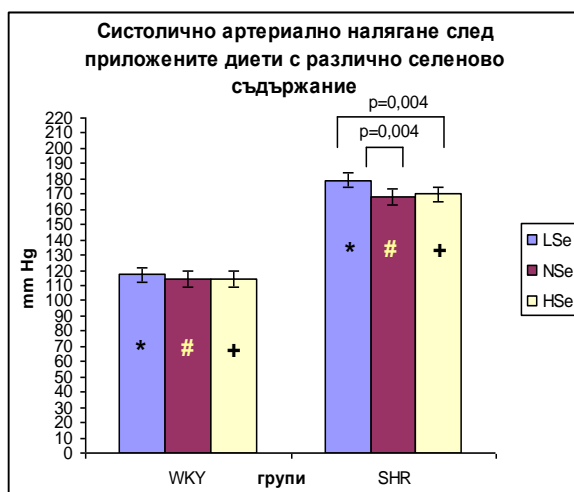
От получените резултати е видно, че ниският прием на Se забавя нарастването на телесното тегло при WKY плъхове, докато при SHR няма такова въздействие, а при тях повишеният прием на Se оказва положителен ефект върху растежа.

2. Систолочно артериално налягане

Измереното систолочно артериално налягане (САН) на двумесечна възраст за 1^{ва} група беше 119 ± 6 mm Hg; 2^{ра} група - 119 ± 2 mm Hg; 3^{та} група - 111 ± 2 mm Hg; 4^{та} група - 170 ± 5 mm Hg; 5^{та} група - 167 ± 7 mm Hg; за 6^{та} група беше 169 ± 8 mm Hg. Няма достоверна разлика между 3-те групи WKY и между 3-те групи SHR.

След 8 седмично третиране на експерименталните животни с различни селенови диети, нямаше достоверна разлика за САН при плъховете WKY на 4 месечна възраст, докато SHR, подложени на диета с ниско Se съдържание

имат по-високо САН в сравнение с другите две групи от същата порода ($p=0,004$; $F=7,07$).

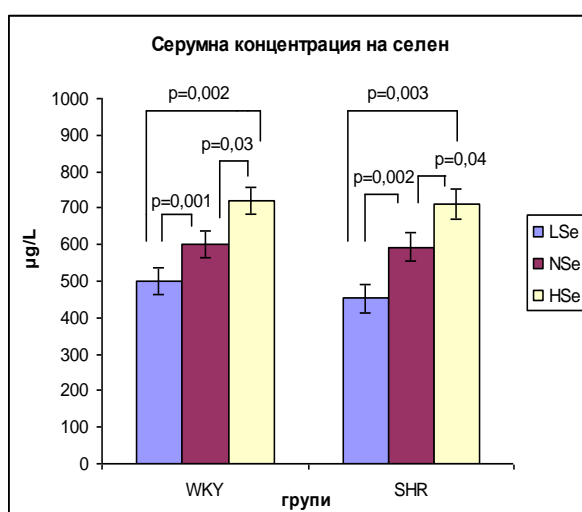


Фиг. 1. Систолно артериално налягане на плъхове WKY ($n=50$) и SHR ($n=52$) на четири месечна възраст, след прилагането на диети с различно селеново съдържание. Стойностите са представени като $(X) \pm SD$ (mm Hg). Разликата в САН между групите WKY и SHR с еднаква селенова диета е обозначена със следните знаци (*; #; +) – $p<0,0001$.

Различният селенов прием не оказва влияние върху САН на нормотензивните животни, докато при хипертензивните плъхове то значимо се повишава при групата на диета с ниско селеново съдържание.

3. Серумна концентрация на селен

Резултатите са представени графично на фиг.2.



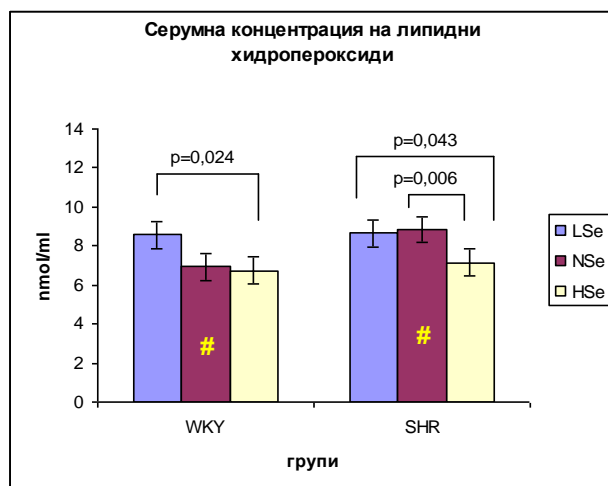
Фиг. 2. Серумна концентрация на селен при WKY и SHR представени като $(X) \pm SEM$ в $\mu g/L$. Отбелязани са достоверните разлики между групите.

С приложените от нас 8 седмични диети с различно селеново съдържание сме успели да постигнем достоверни разлики в серумната концентрация на селен и при WKY и при SHR групите ($p < 0,05$) - вж. фиг. 2.

4. Състояние на оксидативния баланс

4.1. Ниво на липидна пероксидация

Резултатите са представени графично на фиг.3.



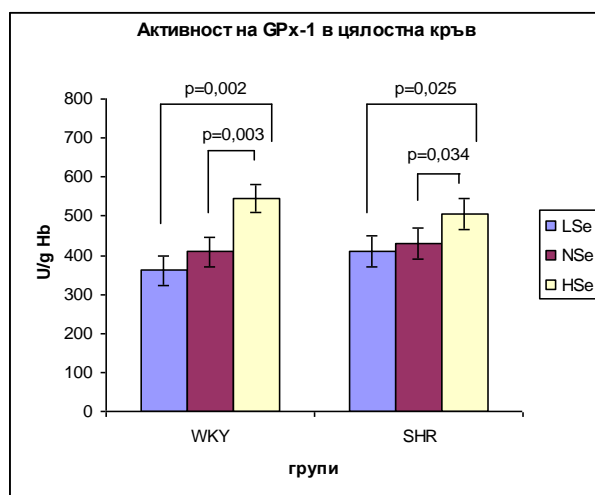
Фиг. 3. Серумна концентрация на липидни хидропероксиди, представена като $(X) \pm \text{SEM}$ в nmol/ml; със знак # са обозначени контролните групи с достоверна разлика ($p = 0,004$; $F = 12,46$).

Резултатите показват, че нивото на липидна пероксидация при контролната група SHR е по-високо, отколкото при контролната група на WKY плъхове ($p = 0,004$; $F = 12,46$). Пониженият прием на Se при WKY плъхове значимо повишава нивото на липидна пероксидация и почти достига това, което е измерено за контролната група SHR, а суплементацията със Se не оказва значимо влияние върху този процес. Прави впечатление, че при SHR животните селеновата суплементация значимо снижава липидната пероксидация спрямо контролната група ($p = 0,006$; $F = 10,20$) до ниво, близко по стойност за контролната група на WKY плъхове.

При извършения регресионен анализ за нормотензивните плъхове не беше установена значима **връзка между САН и серумната концентрация на ROOH** след приложените диети, докато **при спонтанно-хипертензивните плъхове установихме умерена положителна връзка между тези величини** ($p = 0,085$): $\text{CAN} = 156,52 + 1,84 [\text{ROOH}]$; $r = +0,358$; $R^2 = 12,84 \%$; $\text{SE} = 7,13$

4.2. Активност на GPx-1 в цялостна кръв

Установихме достоверни разлики за активност на GPx-1 в цялостна кръв между групите на диета с ниско и нормално селеново съдържание в храната, спрямо групата с високо съдържание на селен и при двете породи плъхове, които са представени графично на фиг. 4.



Фиг. 4. Активност на GPx-1 в цялостна кръв представена като (X)±SEM в U/g Hb.

Получихме значителна по сила положителна корелационна връзка между активността на ензима GPx-1 в цялостна кръв (U/g Hb) от серумната концентрация на Se (µg/L):

За WKY (p=0,0008):

$$GPx-1 = 114,243 + 0,5356 [Se]; \text{ } \underline{r = +0,652}; R^2 = 42,46 \%; SE = 89,54$$

За SHR (p=0,0067):

$$GPx-1 = 259,824 + 0,3341 [Se]; \text{ } \underline{r = +0,615}; R^2 = 37,77 \%; SE = 56,19$$

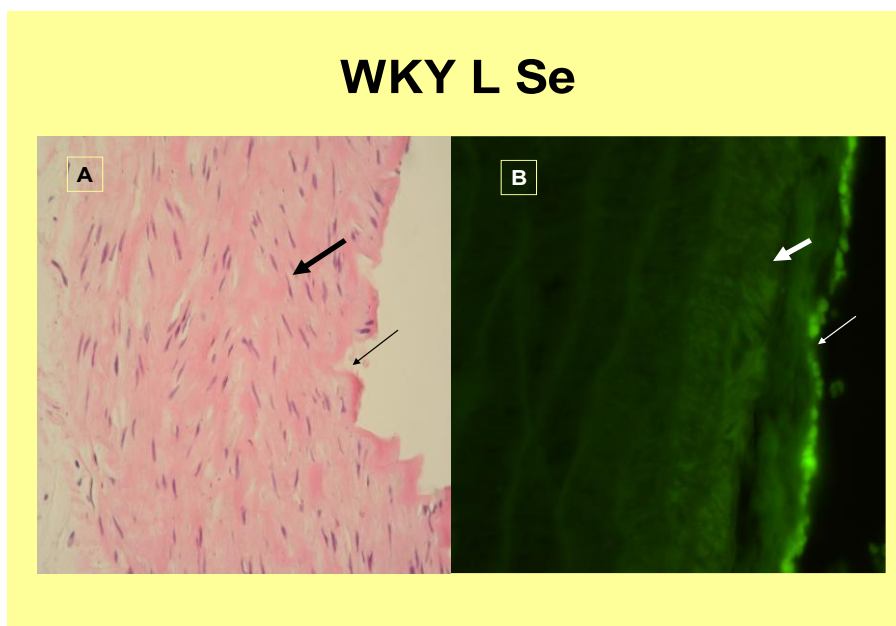
Нашите резултати показват, че селеновата суплементация повишава значимо активността на ензима GPx-1.

4.3. Експресия на GPx-1 в аортна стена и миокард

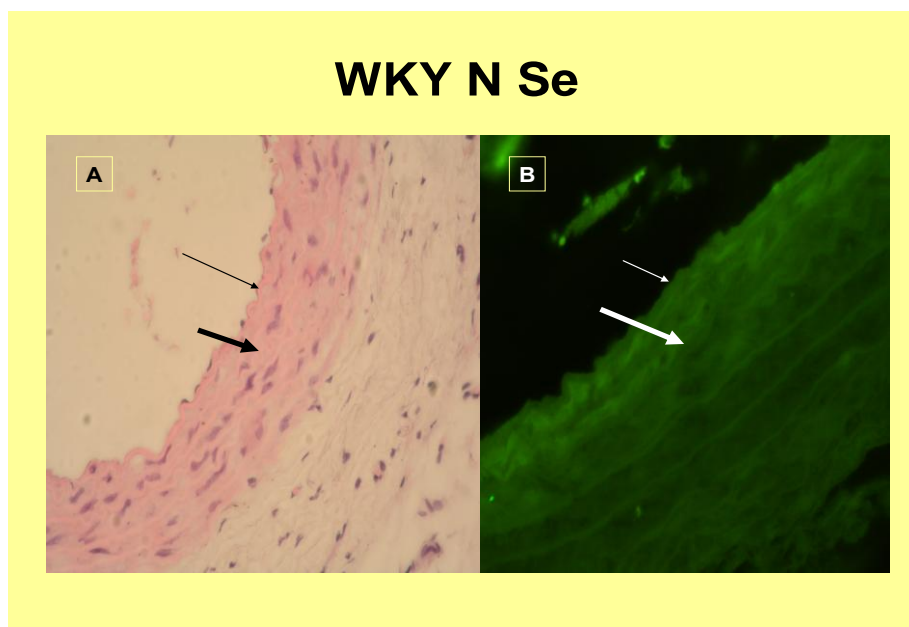
Експресията на GPx-1 в аортната стена и миокарда на изследваните животни бе в права зависимост от приложените селенови диети, серумна концентрация на селен и измерената активност на ензима в цялостна кръв.

На фиг. 5, 6 и 7. са представени фотомикрограми, отразяващи различната степен на имуофлуоресцентно светене в аортна стена при трите групи WKY плъхове. На фиг. 8, 9 и 10. са представени фотомикрограми,

отразяващи различната степен на имунофлуоресцентно светене в аортна стена при трите групи SHR на различни селенови диети.

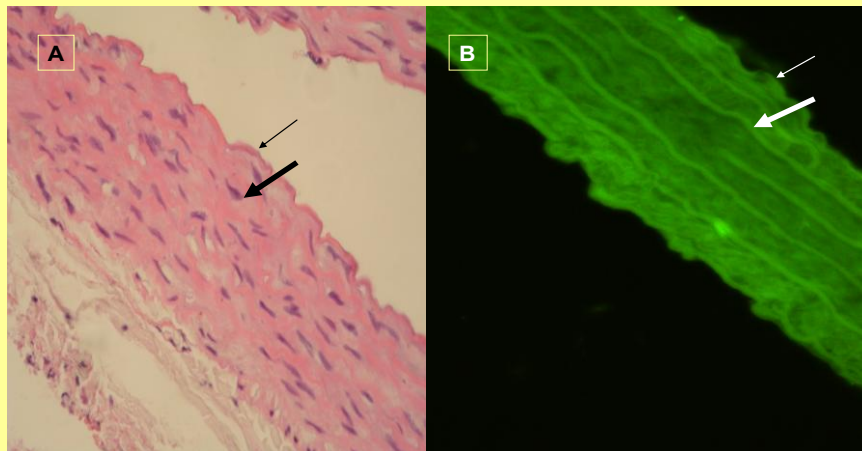


Фиг. 5. Репрезантативна фотомикрограма на аортна стена (тънка стрелка – ендотел; дебела стрелка – медия) на WKY плъхове на ниско-селенова диета. А. Хистология – задебеляване на гладко-мускулния слой и неравност на ендотела (H&E ув. x40). В. Експресия на GPR1 – имунофлуоресцентно светене с нисък интензитет (ув. x40) – участъците със силно светене се дължат на струпаните кръвни клетки по неравния ендотел.



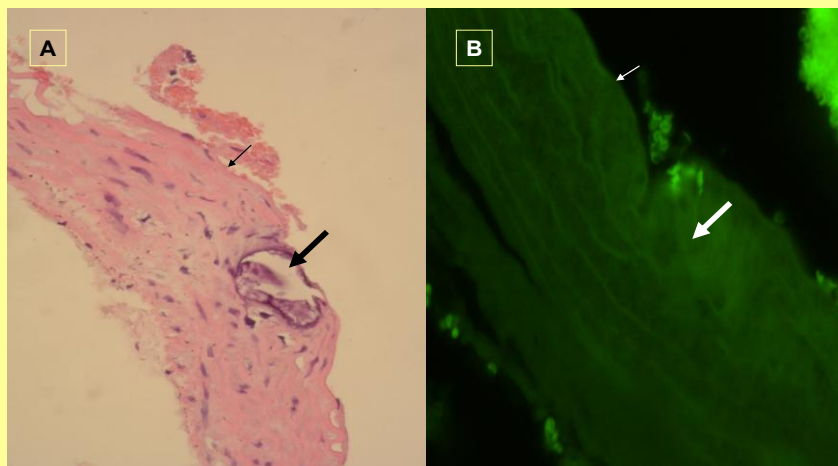
Фиг. 6. Репрезантативна фотомикрограма на аортна стена (тънка стрелка – ендотел; дебела стрелка – медия) на WKY плъхове на нормална селенова диета. А. Хистология – запазен ендотел и нормална дебелина на стената (H&E ув. x40). В. Експресия на GPR1 – имунофлуоресцентно светене с умерен интензитет (ув. x40).

WKY H Se



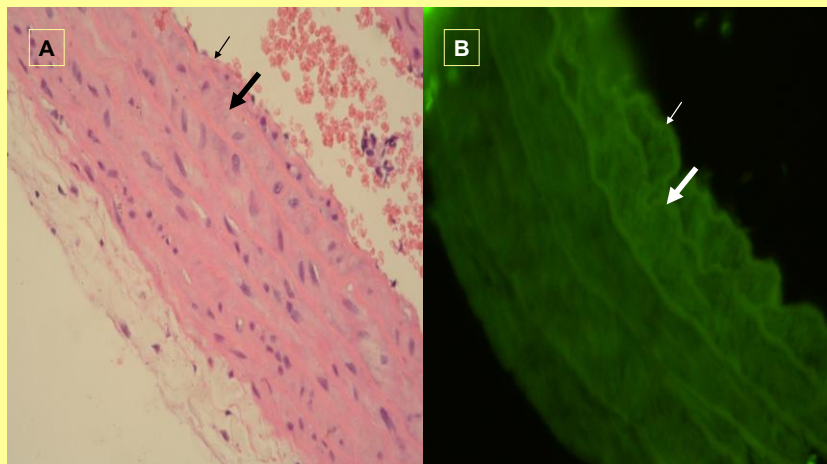
Фиг. 7. Репрезантативна фотомикрограма на аортна стена (тънка стрелка – ендотел; дебела стрелка – медия) на WKY плъхове със селенова суплементация.
А. Хистология – запазен ендотел и дебелина на стената (H&E ув. x40).
В. Експресия на GPRx-1 – имунофлуоресцентно светене с висок интензитет (ув. x40).

SHR L Se



Фиг. 8. Репрезантативна фотомикрограма на аортна стена (тънка стрелка – ендотел; дебела стрелка – медия) на SHR на ниско- селенова диета.
А. Хистология – нарушена цялост на ендотела, липидни и калциеви отлагания субендотелно, пролиферация на гладко-мускулни клетки (H&E ув. x40).
В. Експресия на GPRx-1 – имунофлуоресцентно светене с нисък интензитет (ув. x40).

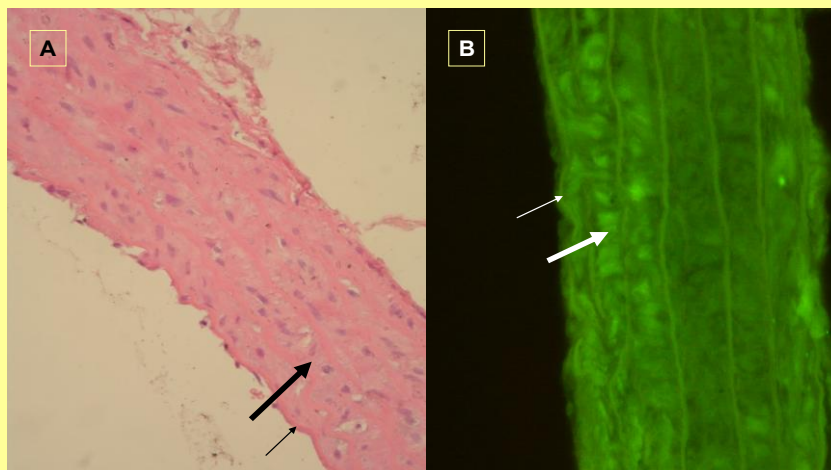
SHR N Se



Фиг. 9. Репрезентативна фотомикрограма на аортна стена (тънка стрелка – ендотел; дебела стрелка – медия) на SHR на нормална селенова диета.

А. Хистология – неравност на ендотела и нормална дебелина на стената (H&E ув. x40). **В.** Експресия на GPR-1 – имунофлуоресцентно светене с умерен интензитет (ув. x40).

SHR H Se



Фиг. 10. Репрезентативна фотомикрограма на аортна стена (тънка стрелка – ендотел; дебела стрелка – медия) на SHR със селенова суплементация.

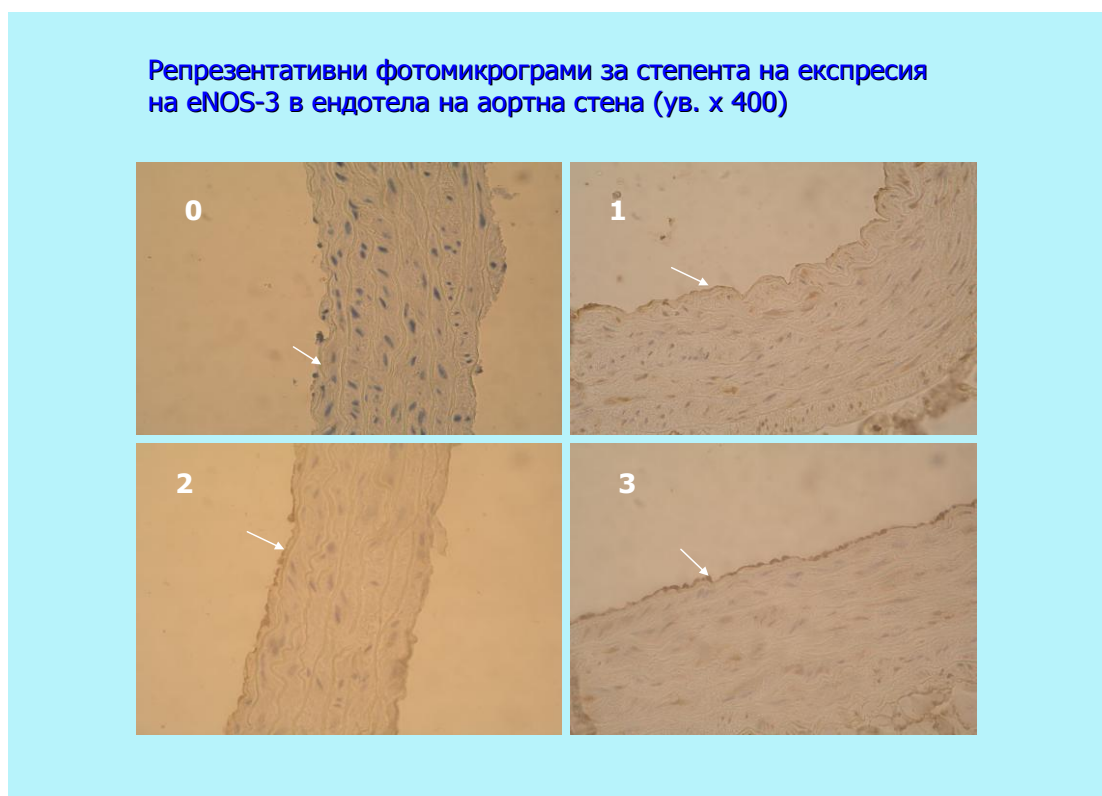
А. Хистология – огнищна загуба на ендотелни клетки и запазена дебелина на стената, (H&E ув. x40). **В.** Експресия на GPR-1 – имунофлуоресцентно светене с висок интензитет (ув. x40).

Промени в експресията на GPx-1, зависими от приложените диети, се наблюдават и в миокарда на изследваните животни.

От представените доказателства се вижда, че диета с 0,25 µg Se / g храна значимо повишава активността на GPx-1 както в кръвта, така и в аортна стена и миокард на плъховете.

4.4. Експресия на eNOS-3 в аортна стена и миокард

На фиг.11. са представени репрезентативни фотомикрограми за степента на експресия на eNOS-3 в аортна стена, според използваната 4-степенна скала на полуколичествено оценяване: 0- липсва експресия; 1- слабо изразена експресия; 2- умерено изразена експресия; 3- силно изразена експресия.



Фиг. 11. Репрезентативна фотомикрограма за степента на експресия на eNOS-3 в аортна стена: 0- липсва експресия; 1- слабо изразена експресия; 2- умерено изразена експресия; 3- силно изразена експресия. Със стрелки е показана експресията в ендотела (увел. x400).

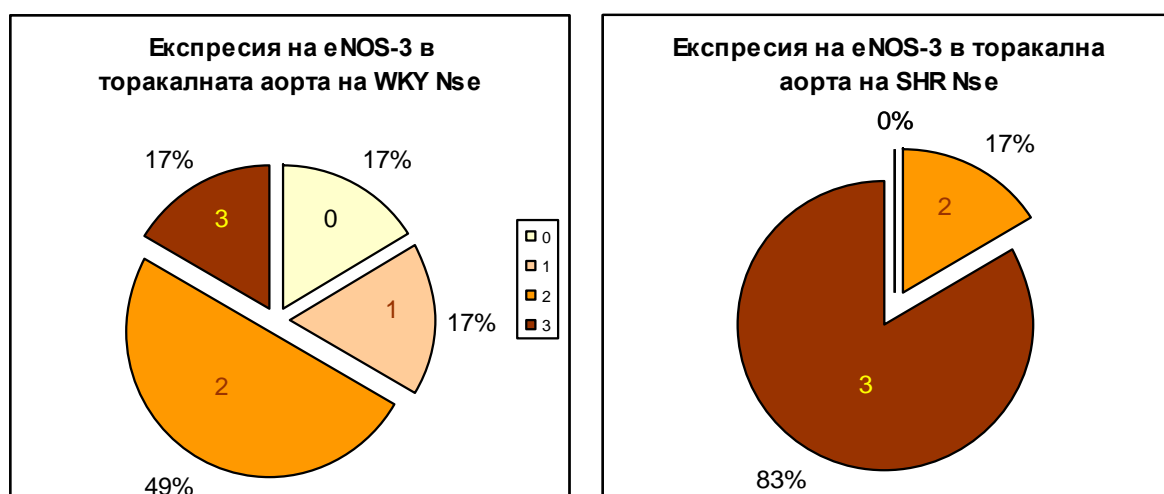
В ендотела и гладкомускулните клетки на аортната стена имаше и четирите степени на експресия на eNOS-3 в различните препарати, докато експресията на ензима в кардиомиоцитите се движеше между слабо и силно-изразена и не липсваше експресия в нито един препарат.

Няма достоверни разлики в степента на експресия на eNOS-3 в торакална и абдоминална аорта и в миокарда между групите WKY плъхове. Отчетените резултати са обработени чрез дескриптивен анализ ($p < 0,1$ за χ^2 тест).

При SHR групите установихме значими разлики в степента на експресия на eNOS-3 в торакална аорта ($p = 0,006$) между трите групи и степента на експресия на ензима в абдоминална аорта ($p = 0,014$) на SHR Hse, но липсва такава за степента на експресия на eNOS-3 в миокард между групите ($p = 0,28$).

Установихме, че суплементацията със селен значимо понижава експресията на eNOS-3 в аортите на SHR, вероятно поради подобрения антиоксидантен статус.

При сравняване на резултатите за експресията на eNOS-3 в аортите на контролните групи WKY и SHR също бе намерена достоверна разлика ($p = 0,035$). При хипертензивните животни експресията на eNOS-3 е по-силно изразена – фиг.12.



Фиг. 12. Степен на експресия на eNOS-3 в торакална аорта на плъхове WKY и SHR на диета с нормално селеново съдържание, оценена полуколичествено по следната скала: 0- липсва експресия; 1- слабо изразена експресия; 2- умерено изразена експресия; 3- силно изразена експресия. Установени достоверни разлики в степента на експресия ($p = 0,035$; Chi-Square test=8,57; Pearson's R=-0,70).

5. Липиден профил

Серумната концентрация на триглицериди е значимо по-висока при WKY LSe в сравнение с SHR LSe, а също и при WKY HSe в сравнение с SHR HSe, но няма значима разлика при контролните групи плъхове.

групи	Триглицериди mmol/L (X) \pm SD	Общ холестерол mmol/L (X) \pm SD	HDL- холестерол mmol/L (X) \pm SD	LDL- холестерол mmol/L (X) \pm SD
1гр. (n=16) WKY LSe	0,659 \pm 0,268 [#]	1,679 \pm 0,297	1,479 \pm 0,295	0,216 \pm 0,056
2гр. (n=16) WKY NSe	0,577 \pm 0,161	1,402 \pm 0,212	1,173 \pm 0,147	0,203 \pm 0,110
3гр. (n=14) WKY HSe	0,594 \pm 0,191 ⁺	1,545 \pm 0,419	1,258 \pm 0,305	0,219 \pm 0,083
4гр. (n=16) SHR LSe	0,460 \pm 0,087 [#]	1,486 \pm 0,297	1,301 \pm 0,304	0,221 \pm 0,091
5гр. (n=18) SHR NSe	0,498 \pm 0,084	1,384 \pm 0,265	1,152 \pm 0,218	0,237 \pm 0,075 [*]
6гр. (n=18) SHR HSe	0,421 \pm 0,095 ⁺	1,299 \pm 0,424	1,145 \pm 0,344	0,152 \pm 0,045 [*]

Таблица 2. Серумна концентрация на триглицериди, общ холестерол и холестеролови фракции в mmol/L, представени като (X) \pm SD. Със знак * е означена статистически достоверна разлика (LSD) между SHR на различни диети, а със знак # и + разликата между SHR и WKY плъхове на еднаква диета (p=0,042; F=2,55).

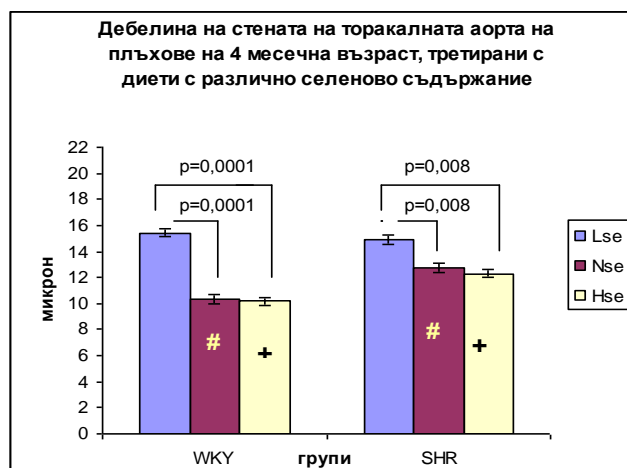
Не бяха установени разлики в серумната концентрация на общия холестерол между изследваните групи животни (p=0,31; F=1,23).

Концентрацията на HDL- холестерола също не показва достоверни различия между групите животни (p=0,2; F=1,52). Концентрацията на LDL- холестерола значимо се понижава при SHR със селенова суплементация, в сравнение с контролната група (95% LSD). Различните селенови диети не променят съществено индекса HDL-/LDL- холестерол при WKY плъхове. Селеновата суплементация обаче значимо повишава съотношението HDL-/LDL- холестерол при SHR в сравнение с контролната група животни (от 4,8 на 7,7).

6. Определяне дебелина на аортна стена

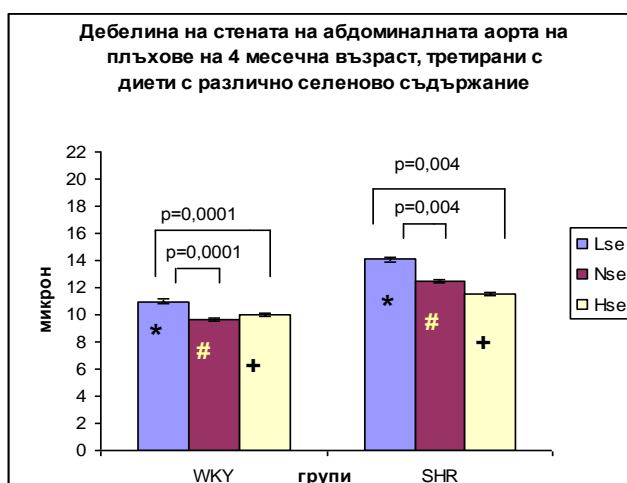
Резултатите от направената морфометрия на торакална и абдоминална аорта са представени графично на фиг. 13 и фиг. 14.

Стената на торакалната аорта при SHR групи с нормално и високо съдържание на Se в храната е по-дебела, отколкото при WKY групи на същата диета.



Фиг. 13. Дебелина на торакалната аорта ($X \pm \text{SEM}$) в микрони. # - разлика между контролните групи; + - разлика между групите WKY и SHR със селенова суплементация ($p=0,0001$; $F=20,27$).

Ниското съдържание на Se в храната води до значимо задебеляване на стената на торакалната аорта и при нормотензивните и при хипертензивните плъхове.



Фиг. 14. Дебелина на абдоминалната аорта ($X \pm \text{SEM}$) в микрони. * - разлика между WKY и SHR на диета с ниско селеново съдържание; # - разлика между контролните групи; + - разлика между групите WKY и SHR със селенова суплементация ($p=0,0001$; $F=21,37$).

Дебелината на абдоминалната аортна стена показва значими различия между групите WKY и SHR на еднаква селенова диета.

При нормотензивните плъхове установяваме достоверно по-дебела аортна стена в групата на ниско-селенова диета спрямо другите две групи WKY ($p=0,0001$; $F=23,36$).

При SHR групата с ниско-селенова диета установихме също значимо по-дебела стена на абдоминалната аорта в сравнение с другите две групи SHR ($p=0,004$; $F=6,50$).

Установихме умерена отрицателна връзка между дебелината на торакална и абдоминална аортна стена и серумна концентрация на селен при WKY плъхове ($n=30$):

за торакална аорта ($p=0,04$)

дебелина на аортна стена (μm)= $16,34-0,007[\text{Se}] \mu\text{g/L}$; $r = -0,42$; $R^2 = 17,24 \%$; $\text{SE}=2,34$

за абдоминална аорта ($p=0,06$)

дебелина на аортна стена (μm)= $11,47-0,002[\text{Se}] \mu\text{g/L}$; $r = -0,38$; $R^2 = 14,28 \%$; $\text{SE}=0,71$

При SHR животните установихме значителна по сила отрицателна връзка между дебелина на аортна стена и серумна концентрация на селен ($n=33$):

за торакална аорта ($p=0,004$)

дебелина на аортна стена (μm)= $18,79-0,009[\text{Se}] \mu\text{g/L}$; $r = -0,56$; $R^2 = 31,62 \%$; $\text{SE}=3,34$

за абдоминална аорта ($p=0,025$)

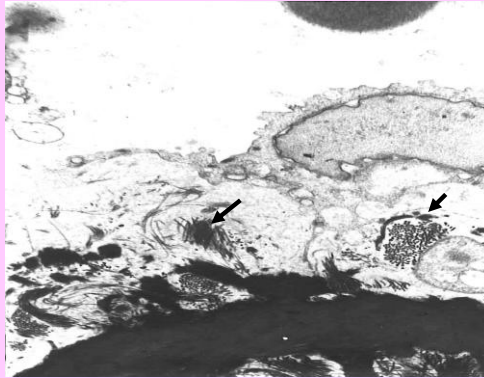
дебелина на аортна стена (μm)= $16,29-0,006[\text{Se}] \mu\text{g/L}$; $r = -0,46$; $R^2 = 19,87 \%$; $\text{SE}=1,79$

Установените в нашия експеримент връзки между дебелината на аортна стена и серумна концентрация на селен ни дават основание да направим извода, че селенът е значим фактор за състоянието на съдовата стена.

7. Електронно-микроскопско изследване на аортна стена

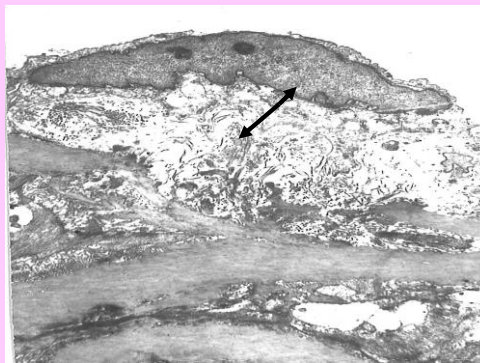
Електронната микроскопия не показва отчетливи разлики между различните групи изследвани животни. На всички електронограми се виждат активно продуциращи колаген гладко-мускулни клетки в медията, но е трудно да се направи количествена оценка на този процес (фиг.15 и фиг.16)

Репрезентативна фотомикрограма на участък от аортна стена на WKY на 4месечна възраст – ув. х6000



Фиг. 15. Репрезантативна фотомикрограма на електронно-микроскопско изследване на аортна стена на WKY. Участък от интима. Колагенови снопчета в различна фаза на развитие – черни стрелки. Ув. х 6000.

Репрезентативна фотомикрограма на участък от аортна стена на SHR на 4месечна възраст – ув. х7000



Фиг. 16. Репрезантативна фотомикрограма на електронно-микроскопско изследване на аортна стена на SHR. Участък от интима. Изразен оток и изтласкване на ендотела от разраснали колагенови снопчета – черни стрелки. Ув. х7000.

8. Имунологични изследвания

Имунологични изследвания за изясняване състоянието на екстрацелуларния матрикс в съдовата стена в условия на различен селенов прием при нормо- и хипертензия бяха проведени на 21 бр. WKY плъха и 28 бр. SHR на 4 месечна възраст.

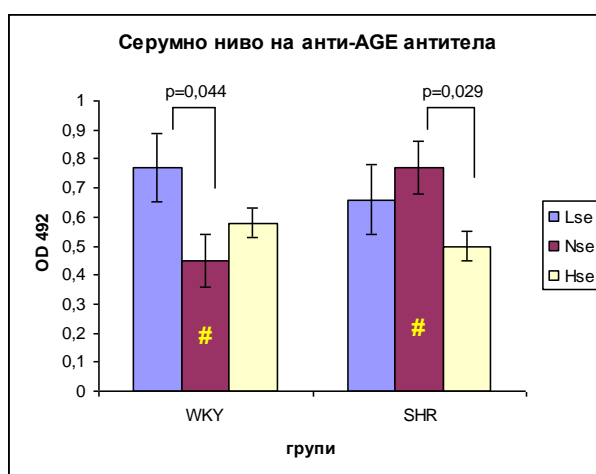
8.1. Имунологични изследвания за антитела срещу късни продукти на гликирането (anti-AGE abs)

Резултатите за серумно ниво на анти-AGE антитела са представени графично на фиг. 17.

Контролната група на нормотензивните плъхове има значимо по-ниски стойности на анти-AGE антитела в сравнение с контролната група SHR.

Селеновата суплементация не променя съществено нивото на анти-AGE антителата при WKY плъхове, но ниският селен в диетата води до значимото им повишение ($p=0,009$; $F=8,53$), достигайки стойности близки до тези на контролната група SHR.

При сравняване на групите SHR се установи, че диетата с повишено селеново съдържание значимо понижава нивото на анти-AGE антителата ($p=0,029$; $F=5,64$), а ниският прием на Se не ги променя съществено.



Фиг. 17. Серумно ниво на анти-AGE антитела. Резултатите са представени като $(X) \pm SEM$ на OD. Със знак # са означени различията между контролните групи WKY и SHR ($p=0,009$; $F=8,53$).

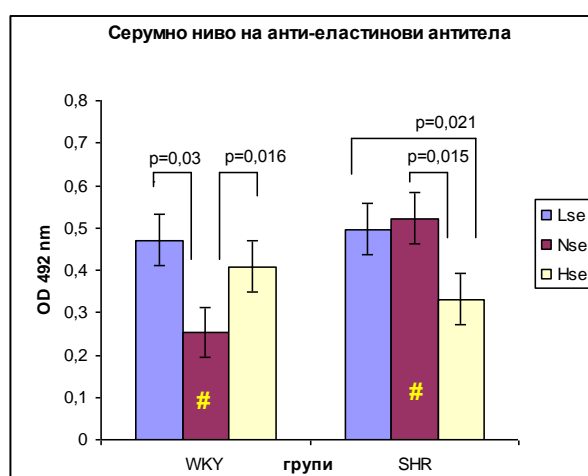
8.2. Имунологични изследвания за анти-еластинови антитела (AE abs)

Антителата, насочени срещу деградационния продукт на еластина (α -еластин) са маркер за еластин-деградационните процеси. У здрави индивиди тези антитела са част от нормалния хомеостатичен механизъм, който е отговорен за почистването на организма от увредените еластинови структури. На фиг. 18. са представени графично резултатите от определяне концентрацията на анти- α - еластинови антитела в серума на изследваните животни.

От получените резултати се вижда, че селенова диета, различна от нормалната води до значимо повишение на AE abs при WKY плъхове. Серумната концентрация на AE abs при контролната група WKY плъхове е значимо по-ниска от тази, отчетена при контролната група SHR.

При SHR се установи значимо понижение на AE abs при групата със селенова суплементация, сравнена с другите две групи и близка до тази на контролната група WKY.

Суплементацията със Se води до понижено разграждане на еластина при SHR, което е предпоставка за по-добра еластичност и намалена ригидност на съдовите стени.



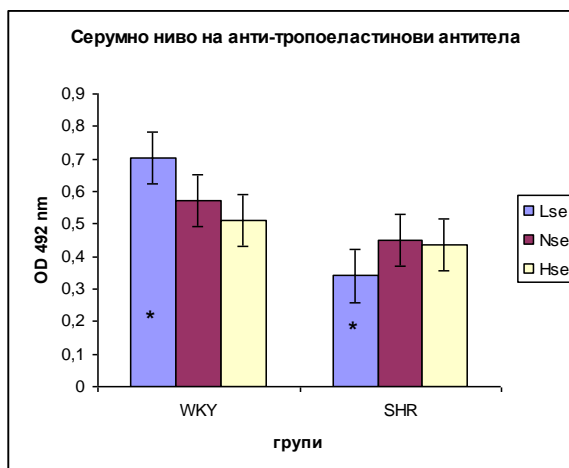
Фиг. 18. Серумно ниво на анти- α - еластинови антитела. Резултатите са представени като (X) \pm SEM на OD. Със знак # са означени различията между контролните групи WKY и SHR ($p=0,004$; $F=3,99$).

Установихме умерена положителна връзка между дебелина на аортна стена и серумно ниво на анти- α - еластиновите антитела при SHR ($p=0,08$): $[AE\ abs] = 0,161 + 0,022 \text{ дебелина на торакална аорта } (\mu m)$, $r = + 0,35$; $R^2 = 12,57\ %$; $SE=0,14$

8.3. Имунологични изследвания за анти-тропоеластинови антитела (ATE abs)

Антителата срещу тропоеластина, прекурсор на еластина са маркер за нивото на еластинов синтез. Резултатите от изследването са представени графично на фиг. 19.

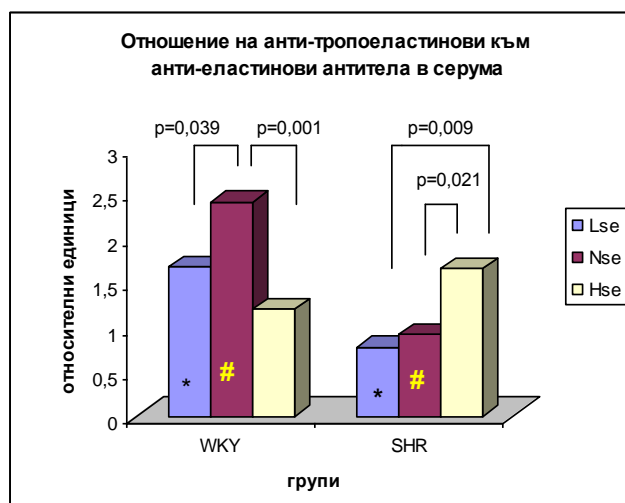
Нивото на анти-тропоеластиновите антитела при WKY плъховете беше по-високо в сравнение с SHR на еднакви селенови диети, но достоверна разлика бе отчетена само за групите с ниско съдържание на Se в диетата ($p=0,006$; $F=3,73$). Не бяха установени достоверни разлики между групите WKY плъхове на различни селенови диети, както и между трите групи SHR.



Фиг. 19. Серумно ниво на анти-тропоеластинови антитела. Резултатите са представени като $(X) \pm SEM$ на OD. Със знак * са означени различията между групите WKY и SHR с ниско-селенова диета ($p=0,006$; $F=3,73$).

Отношението между ATE abs и AE abs ни дава представа за отношението между синтез и разграждане на еластина. Поради това ние изчислихме това съотношение и обработихме получените резултати (фиг. 20).

При SHR на ниско-селенова диета и диета с нормално съдържание на селен, сравнени с подложени на същите диети WKY плъхове, преобладава процесът на еластинова деструкция.



Фиг. 20. Отношение на анти-тропоеластинови към анти-еластинови антитела. Резултатите са представени като (X) . Със знак * са означени различията между

групите WKY и SHR с ниско-селенова диета, а с # различията между контролните групи WKY и SHR ($p=0,001$).

При SHR селеновата суплементация значимо повишава съотношението между процесите на синтез и разграждане на еластина, докато при WKY плъховете диета с препоръчително селеново съдържание е тази, която има анаболен ефект върху еластиновия метаболизъм.

Б. РЕЗУЛТАТИ ПРИ WKY и SHR ПЛЪХОВЕ, ТРЕТИРАНИ С РАЗЛИЧНИ СЕЛЕНОВИ ДИЕТИ В ПЕРИОД НА ЗРЯЛОСТ

1. Телесна маса

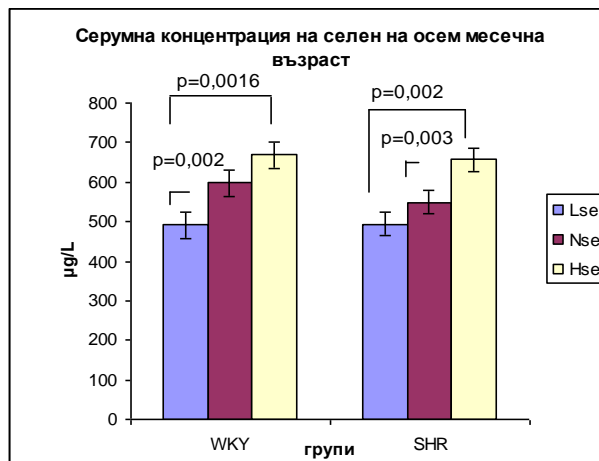
Телесната маса на изследваните животни на шест-месечна възраст, при започване на третирането с различни селенови диети беше: 365 ± 9 g за WKY плъхове и 335 ± 6 g за SHR.

2. Систолочно артериално налягане

Измереното систолочно артериално налягане (САН) на шест-месечна възраст за WKY беше 124 ± 6 mm Hg, а за SHR - 186 ± 8 mm Hg. Няма достоверна разлика между 3-те групи WKY и между 3-те групи SHR.

3. Серумна концентрация на селен

С приложените от нас 8-седмични диети с различно селеново съдържание на плъхове в зряла възраст при WKY установихме значими разлики в серумната концентрация на Se за плъховете с ниско-селенова диета, спрямо другите две групи, докато при SHR суплементацията със Se значимо повишава серумното му ниво спрямо другите две групи от същата порода (фиг.21).



Фиг. 21. Серумна концентрация на селен при 8-месечни плъхове, третиран с диети с различно селеново съдържание. Резултатите са представени като $(X) \pm SEM$ в $\mu\text{g/L}$.

4. Състояние на оксидативния баланс

4.1. Ниво на липидна пероксидация

Серумната концентрация на липидни хидропероксиди като $(X) \pm SEM$ в nmol/ml е представена с цифрови стойности графично на фиг.22.

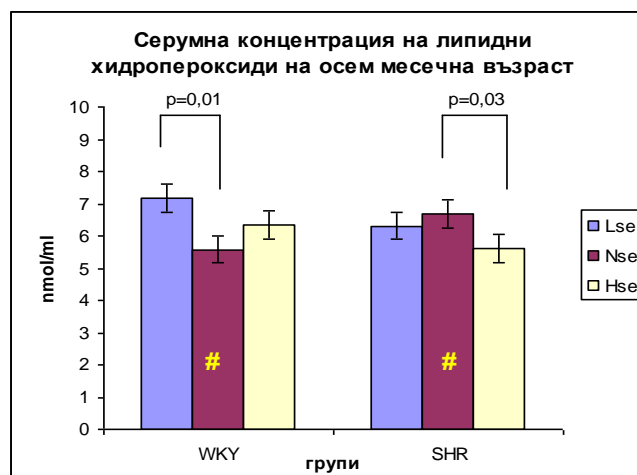
Установихме достоверно по-висока концентрация при контролната група на хипертензивните плъхове в сравнение с контролната група на нормотензивните ($p=0,035$).

При WKY ниско-селеновата диета значимо повишава серумната концентрация на ROOH ($p=0,01$), а суплементацията със селен не води до значими промени.

При SHR селеновата суплементация значимо понижава липидната пероксидация ($p=0,03$), а ниско-селеновата диета не я променя значимо.

При SHR ($n=32$) има достоверна обратна значително силно изразена връзка между серумна концентрация на липидни хидропероксиди и активност на GPx -1 в цялостна кръв ($p=0,002$).

$[\text{ROOH}] = 8,35 - 0,005\text{GPx}$; $r = -0,59$; $R^2 = 35,07\%$; $SE=0,9$



Фиг. 22. Серумна концентрация на липидни хидропероксида ($X \pm SEM$) в nmol/ml на осем месечна възраст на плъхове WKY и SHR на различни селенови диети. # - достоверна разлика между WKY NSe и SHR NSe ($p=0,035$).

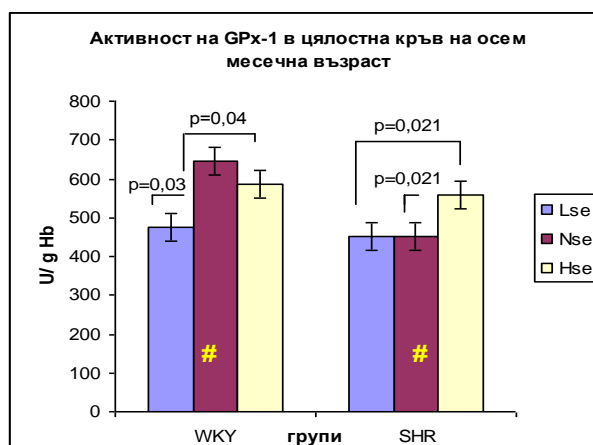
4.2. Активност на GPx-1 в цялостна кръв

Резултатите за активността на GPx-1 в цялостна кръв са представени графично като ($X \pm SEM$) в U/g Hb на фиг. 23.

Установихме достоверно по-висока активност на GPx-1 в цялостна кръв при контролната група на нормотензивните плъхове в сравнение с контролната група на хипертензивните ($p=0,002$).

При WKY ниско-селеновата диета значимо понижава активността на GPx-1 в цялостна кръв.

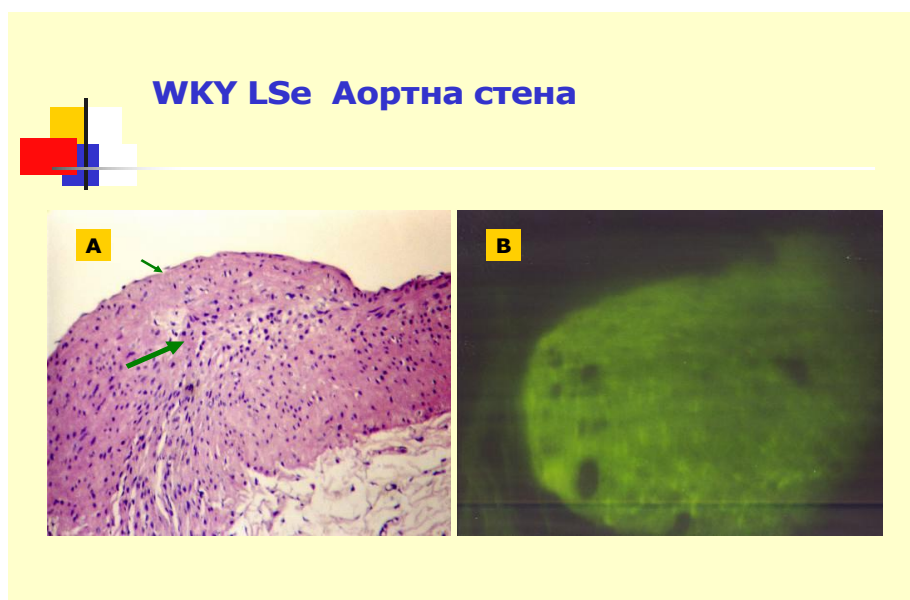
При SHR селеновата суплементация повишава активността на GPx-1 в цялостна кръв ($p=0,021$).



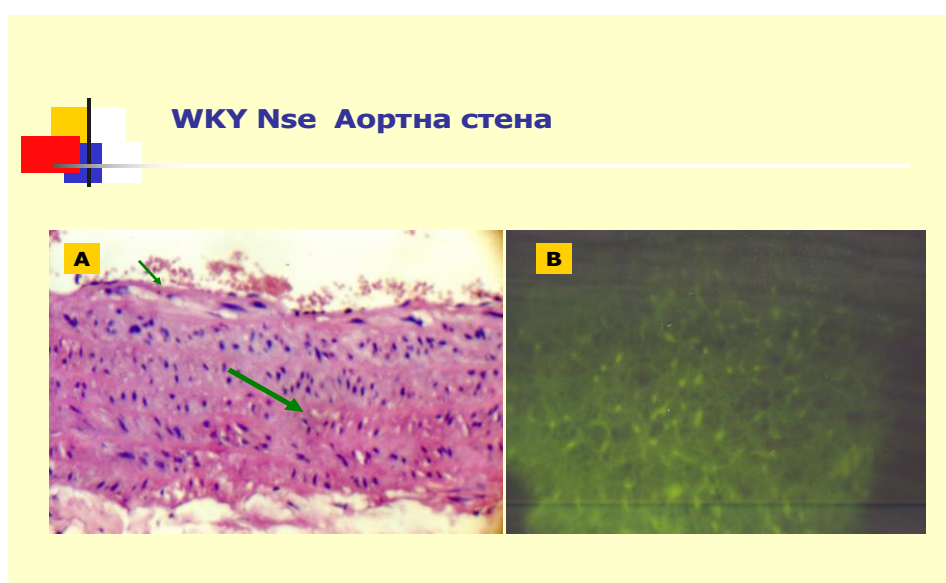
Фиг. 23. Активност на GPx-1 в цялостна кръв представена като ($X \pm SEM$) в U/g Hb. Със знак # - достоверна разлика между WKY NSe и SHR NSe ($p=0,002$).

4.3. Експресия на GPx-1 в аортна стена

Репрезантативни фотомикрограми от фиг. 24. до фиг. 29. показват степента на експресия на GPx-1 в аортна стена на плъховете WKY и SHR на осем месечна възраст.

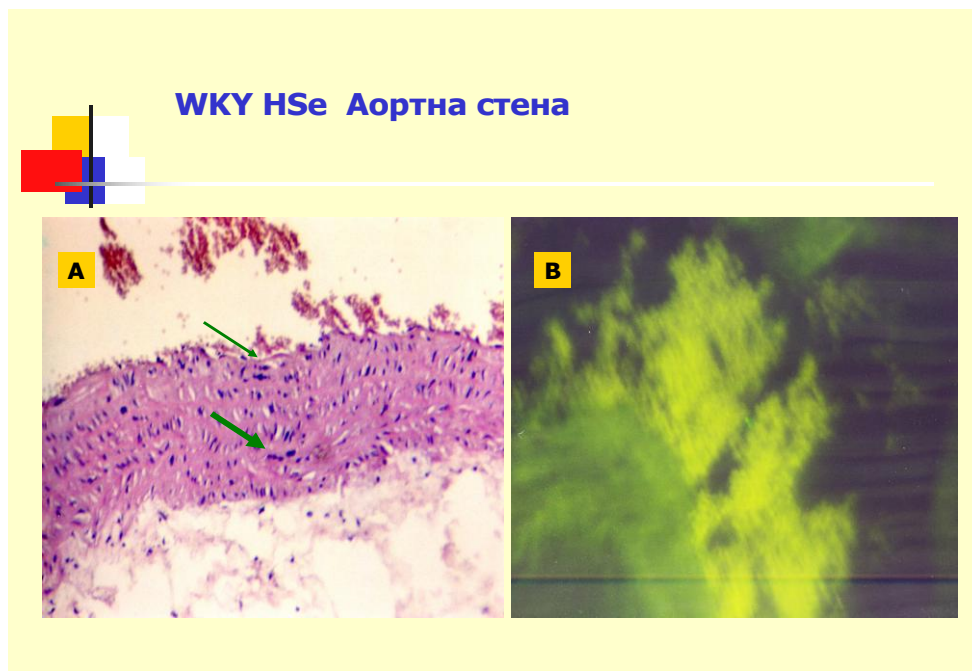


Фиг. 24. Репрезантативна фотомикрограма на аортна стена от плъх WKY LSe. А - Н&Е ув. x20, неравност на ендотелния слой с леки разязвявания (тънка стрелка), фибросклеротична плака, ангажираща цялата дебелина на съда до адвентицията, множество разпръснати некрози в медията и липидни отлагания (дебела стрелка); В - експресия на GPx-1 - имунофлуоресцентно светене с нисък до умерен интензитет (ув. x40).



Фиг. 25. Репрезантативна фотомикрограма на аортна стена от плъх WKY NSe. А - Н&Е ув. x20, пролиферация на ендотелния слой с формиране на огнищно-прониниращи към лумена образувания (тънка стрелка), фокални некробиотични

промени в медията и отлагане на малки липидни капки (дебела стрелка); В - експресия на GPrx-1 - имунофлуоресцентно светене с умерен интензитет (ув. x40).



Фиг. 26. Репрезантативна фотомикрограма на аортна стена от плъх WKY HSe. А - Н&Е ув. x20, участък на ерозиране на ендотела с начално пристенно тромбозиране (тънка стрелка). В гладкомускулната стена - фокуси на липидно отлагане с макрофагеална и фибробластна пролиферация (дебела стрелка); В - експресия на GPrx-1 - имунофлуоресцентно светене с много висок интензитет (ув. x40).



Фиг. 27. Репрезантативна фотомикрограма на аортна стена от плъх SHR LSe. А - Н&Е ув. x20, фибросклеротична плака с множество некрози (тънка стрелка), и липидни отлагания (дебела стрелка) в медията, ангажираща цялата съдова стена

от ендотела до адвентицията; В - експресия на GPx-1 - имунофлуоресцентно светене с нисък интензитет (ув. x40).



Фиг. 28. Репрезантативна фотомикрограма на аортна стена от плъх SHR NSe. А - Н&Е ув. x20, пролиферация на ендотелни клетки, проминиращи към лумена (тънка стрелка), единични некробиотични промени и малки липидни капки в медията (дебела стрелка); В - експресия на GPx-1 - имунофлуоресцентно светене с умерен интензитет (ув. x40).



Фиг. 29. Репрезантативна фотомикрограма на аортна стена от плъх SHR HSe. А - Н&Е ув. x20, еднаква дебелина на съдовата стена с умерена пролиферация на ендотела и ерозии (тънка стрелка), леко изразена хиперплазия на миоцити и малки липидни капки в медията (дебела стрелка); В - експресия на GPx-1 - имунофлуоресцентно светене с висок интензитет (ув. x40).

Силата на имунофлуоресценция е в пряка зависимост от съдържанието на селен в диетите, с които са третирани опитните животни.

4.4. Експресия на eNOS-3 в аортна стена и миокард

При отчитането на експресия на eNOS-3 в съдова стена и миокард при WKY плъхове (n=18) на осем месечна възраст не бяха установени закономерни различия между групите с различен прием на Se.

При SHR (n=18) има значимо по-слабо изразена експресия на ензима в аортна стена при животните със селенова суплементация, отколкото при другите 2 групи (χ^2 test =21,21; p=0,0017).

5. Липиден профил

Резултатите от изследването на липидния профил са представени в mmol/L (X) \pm SD в Таблица 3.

групи	Триглицериди	Общ холестерол	HDL-холестерол	LDL-холестерол
7гр.WKY LSe (n=12)	0,99 \pm 0,17 [#]	1,77 \pm 0,23	0,99 \pm 0,20*	0,45 \pm 0,04*
8гр.WKY NSe (n=10)	0,91 \pm 0,22 [#]	1,86 \pm 0,21	1,15 \pm 0,22	0,42 \pm 0,04
9гр.WKY HSe (n=12)	1,10 \pm 0,26 [#]	1,79 \pm 0,30	1,28 \pm 0,25*	0,36 \pm 0,07*
10гр.SHR LSe (n=10)	0,43 \pm 0,09*	1,56 \pm 0,24	1,10 \pm 0,22*	0,44 \pm 0,09
11гр.SHR NSe (n=10)	0,47 \pm 0,11	1,70 \pm 0,45	1,34 \pm 0,39	0,34 \pm 0,14
12гр.SHR HSe (n=12)	0,58 \pm 0,10*	1,80 \pm 0,13	1,49 \pm 0,11*	0,39 \pm 0,06

Таблица 3. Серумна концентрация на триглицериди, общ холестерол и холестеролови фракции в mmol/L, представени като (X) \pm SD. Със знак * са означени достоверно по-високи триглицериди (p=0.028, F=4,19) и HDL-холестерол (p=0.023, F=4,50) за SHR на различни диети; за WKY със * е означен HDL-холестеролът на животните със суплементация на Se, който е по-висок, отколкото на тези с недостиг на Se (p=0.03, F=3,74) и LDL- холестеролът им, който е значимо по-нисък (p=0.004, F=6,97); [#] - значимо по-високи триглицериди при WKY, сравнени с SHR (p=0,0004; F=6,01).

Не бяха установени значими разлики между групите за общ холестерол, който е в границите на нормата за плъхове (1,3-2,1mmol/L).

Серумната концентрация на триглицериди е значимо по-висока при WKY в сравнение с плъховете SHR.

При WKY не бяха установени значими разлики между 3-те групи за триглицериди и общ холестерол, докато при холестероловите фракции има статистически достоверни разлики. HDL- холестеролът на животните със суплементация на Se е по-висок, отколкото на тези с недостиг ($p=0.03$; $F=3,74$), докато LDL- холестеролът им е значимо по-нисък, в сравнение с групата на ниско- селенова диета ($p=0.004$; $F=6,97$).

Не бяха установени значими разлики между групите SHR за общ холестерол, и LDL- холестерол. HDL- холестеролът на животните със суплементация на Se е по-висок, отколкото на тези с недостиг ($p=0.023$; $F=4,50$).

Отчита се повишаване на съотношението между HDL- и LDL- холестерола, в зависимост от селеновото съдържание в диетата, при WKY от 2,2 до 3,6 и при SHR от 2,5 до 3,8.

6. Хистологични промени и определяне дебелина на аортна стена и коронарии

С цел сравнително проучване, хисто-морфологичните промени са систематизирани в 8 рубрики: ендотелна хиперплазия с ерозивни изменения; разязвявания; пристенни тромбозирания; начално формиране на плаки, със задебеляване на съдовата стена с включване на ендотела, миоцити и хистиоцити; формиране на плаки с клетъчна хиперплазия; плаки с разязвявания; медионекроза с хистиоцитно разрастване с макрофагеална реакция; оток на гладката мускулатура, разслояване на миофибриите и миоцитна хиперплазия.

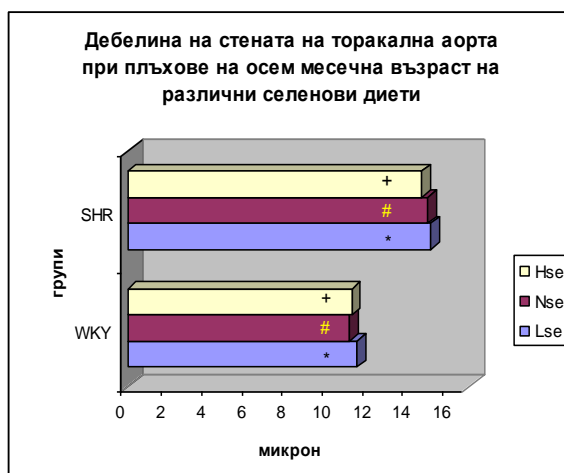
Хисто-морфологичното изследване и при трите групи експериментални животни WKY на 8-месечна възраст показва еднотипни промени, които най-вероятно са възрастови. Различие представлява формирането на фибросклеротични плаки при всички животни от групата с ниско съдържание на Se в диетата - 12/12. При групата с нормално съдържание на Se са - 7/10, а при

високата доза - 7/12. Животните от тази група показват най-слаба степен на развитие на склеротичния процес - вж. фиг. 24, 25 и 26.

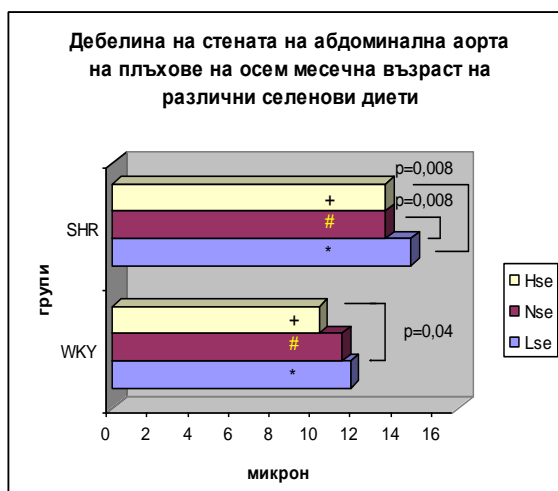
Животните от WKY LSe, показват по-тежка форма на проява на дегенеративните изменения в аортата, изразяваща се в множественост на фибро-склеротичните плаки, които са в по-напреднал стадий на развитие, задебеления на съдовата стена, хълмистоподобни формирания, които деформират и стенозират лумена и могат да предизвикат хронични исхемични усложнения. При животните със суплементация на Se са налице хистологични данни за забавяне и по-лека степен на проявление на дегенеративните процеси в стената на аортата.

Морфометрията на торакална аорта не установява значителни разлики, докато дебелината на абдоминалната аорта при WKY HSe е по-малка от тази на животните от WKY LSe ($p=0,04$) - вж.фиг. 31. Прави впечатление, че при плъховете WKY на 8 месечна възраст абдоминалната аорта на животните с нисък и адекватен Se в диетата е по-голяма, отколкото дебелината на торакалната аорта.

Дебелината на стената и на торакалната и на абдоминалната аорта при плъховете WKY и SHR на еднакви селенови диети на 8 месечна възраст значимо се различава - фиг. 30. и фиг. 31. ($p<0,05$).



Фиг. 30. Дебелина на стената на торакална аорта на плъхове WKY и SHR на 8 месечна възраст на различни селенови диети (X) в µm. Със знак* - разлика между WKY LSe и SHR LSe; # - WKY NSe и SHR NSe; + - WKY HSe и SHR HSe ($p<0,05$).

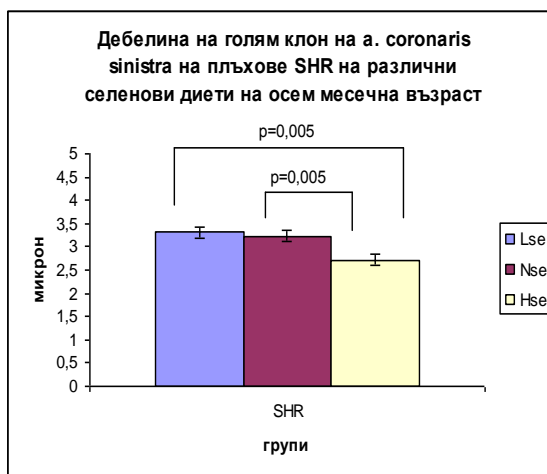


Фиг. 31. Дебелина на стената на абдоминална аорта на плъхове WKY и SHR на 8месечна възраст на различни селенови диети (X) в µm. Със знак * е обозначена разлика в дебелината между WKY LSe и SHR LSe; с # - WKY NSe и SHR NSe; с + разлика между WKY HSe и SHR HSe ($p<0,05$).

Няма значими разлики в дебелината на лява коронарна артерия на WKY плъхове на различни селенови диети.

Дегенеративните процеси при SHR ангажират по-обширни участъци от аортата и водят до тежки фибро-склеротични изменения на съдовата стена, резултиращи в стеноза на съдовете, която е предпоставка за нарушена перфузия на жизненоважни органи. Особено силно са засегнати плъховете от група SHR с ниско селеново съдържание в диетата, при които има значимо задебеляване на стената на абдоминалната аорта - вж. фиг. 31.

SHR със суплементация на селен имат значимо по-малка дебелината на лява коронарна артерия, сравнени с другите 2 експериментални групи плъхове – вж. фиг. 32.



Фиг. 32. Дебелина на стената на голям клон на лява коронарна артерия на плъхове SHR на 8месечна възраст на различни селенови диети (X)±SEM в µm.

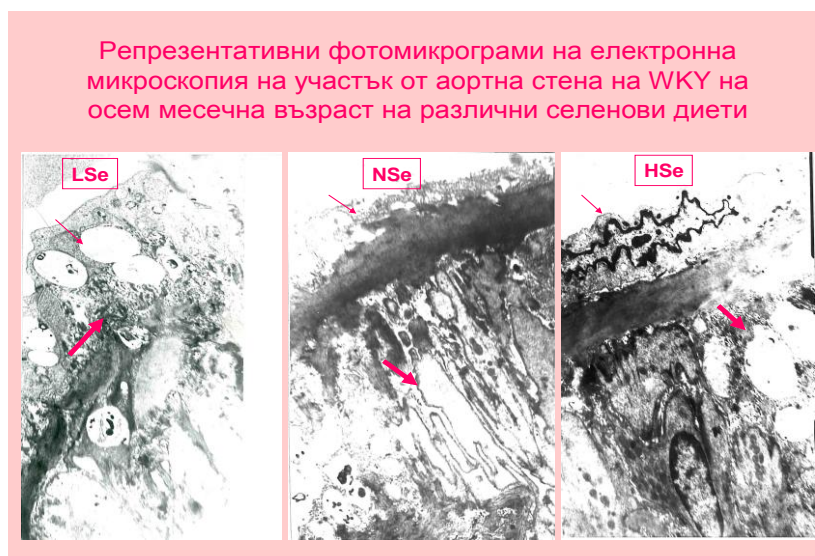
И при плъхове WKY и при SHR на диета с високо селеново съдържание на осем месечна възраст се установява най-слаба степен на развитие и разпространение на дегенеративните промени в съдовата стена.

Тези морфологични промени кореспондират с промените в активността на GPx-1, липидната пероксидация и липидния профил на плъховете на диета с различно селеново съдържание.

Налице са хистологични данни, че суплементацията със Se не предотвратява, но значимо забавя развитието на дегенеративни промени в съдовата стена на плъховете.

7. Електронно-микроскопско изследване на аортна стена

На фиг. 33. са показани репрезентативни фотомикрограми от електронно-микроскопското изследване на аортна стена на плъховете WKY на различни селенови диети на 8 месечна възраст.



Фиг. 33. Репрезантативни фотомикрограми на електронна микроскопия на аортна стена на плъхове WKY на 8месечна възраст на различни селенови диети:

LSe ув. х 6100 - Дебелата стрелка показва формиране на плака, проминираща в лумена с колагенизация и мастни сгрупвания -тънка стрелка.

NSe ув. х 5000 - Тънката стрелка показва ерозия на ендотелни клетки, а дебелата стрелка – гладко-мускулни клетки с хипертрофия, просветлена цитоплазма и причудливи контури, демонстриращи усилен синтез на колаген

HSe ув. х 6100 - Тънката стрелка показва запазен ендотел, а дебелата стрелка – пролиферация на гладко-мускулни клетки и група вакуоли, обхванати от колагенови нишки.

Електронно-микроскопски са проследявани ултраструктурата на интимата, ендотелните клетки с вътрешната еластична мембрана, както и медията – високите 2-3 ламеларни реда на аортна стена.

Най тежки са промените при групата с ниско съдържание на Se в храната, където се оформя картината на ерозиране на ендотела, процес на образуване на плаки, състоящи се от лизозомални конгломерати (най- вероятно произхождащи от кръвни клетки), които се капсулират от колагенови влакна и се обгръщат от ендотел. На места се установяват липидни отлагания, обгърнати от ендотелни клетки. Има процеси на силно колагенизиране на вътрешната еластична мембрана, като част от колагена пробива и се обхваща от ендотела. При някои животни има изразен оток на интимата и медията с разслояване и запълване с колаген. Във формираните плаки се наблюдава процес на клетъчна инфилтрация, предизвикващ силно задебеляване и проминиране към лумена на аортата. Тези плаки се състоят предимно от хаотично струпани гладко-мускулни клетки и фиброцити в различен етап от своето развитие. В аортната стена гладко-мускулните клетки функционално се трансформират към груби фиброцити, което води до задебеляване и загуба на еластичност.

При групата с нормално съдържание на Se в храната са налице пристенни тромбозирания, обхванати от колагенни снопчета. Наблюдава се пролиферация на гладко-мускулни клетки и бурно производство на колаген между еластичните мембрани на медията и върху вътрешната еластична мембрана.

При групата със суплементация на Se в храната, ендотелът покрива интимата. Ендотелните клетки показват различна степен на зрялост и физиологична активност. При всички животни се наблюдава активиране на гладко-мускулните клетки, съпроводено с усилена продукция на колаген и новообразуван еластин.

На фиг. 34., 35. и 36. са представени репрезентативни фотомикрограми на хистологични и ултраструктурни промени в аортната стена на плъхове SHR на 8 месечна възраст, третирани с различни селенови диети.

Групата плъхове SHR LSe има следната електронно-микроскопска характеристика:

- Процес с ерозия на ендотела и начало на образуване на атероматозни плаки.
- Под вътрешната еластична мембрана се визуализират гладко- мускулни клетки в процес на дегенерация и вакуолизация на цитоплазмените структури.
- Еластичната мембрана е с нарушен рисунък. На много места е задебелена и се установяват разраствания на еластина към и между гладко-мускулните елементи.
- Гладко-мускулните клетки са в различна степен на зрялост и функционално състояние. Интересен факт е, че независимо от тяхното функционално състояние, при всички се установяват мастни вакуоли в цитоплазмата им, както и мастни капки в междумускулните пространства, разположени сред колаген.



Фиг. 34. Репрезантативни фотомикрограми на светлинна и електронна микроскопия на аортна стена на плъхове SHR на 8месечна възраст на диета с ниско съдържание на Se. Тънка стрелка – показва промените в ендотела, а дебелата – промени в медията.

Характерните промени в групата SHR NSe са следните:

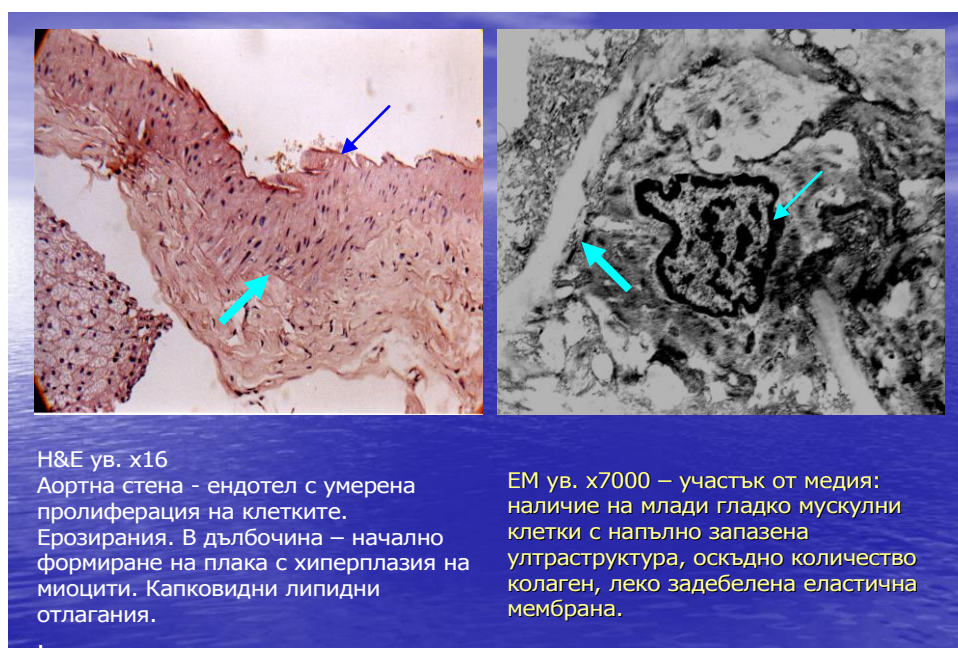
- Ендотел – отслояване, мацериране и пикнотични изменения (процес на стареене на ендотелните клетки със силно нагънати и пикнотични ядра). Цитоплазмата е с множество вакуоли, най-вероятно изпълнени с липидни включения.
- Силно задебелена еластична мембрана. Под нея, изобилие от големи и по-малки вакуоли, най-вероятно натоварени с липиди.
- Хиперплазия на гладкомускулни клетки. Част от тях са в процес на напреднало стареене с тъмни пикнотични ядра и балониране на плазмените органели – митохондрии. Разслояване на гладкомускулните слоеве с формиране на оптически празни пространства, които започват да се изпълват със свеж колаген.
- Масивно разрастване на колаген и еластин. Процесът води до загуба на контрактилитета и липса на еластичност на стената.



Фиг. 35. Репрезантативни фотомикрограми на светлинна и електронна микроскопия на аортна стена на плъхове SHR на 8месечна възраст на диета с нормално съдържание на Se. Н&Е - тънката стрелка показва промените в ендотела, а дебелата – промени в медията. ЕМ на участък от медия - дебела стрелка показва хиперплазията на гладко-мускулните клетки и разрастването на колаген, а тънката стрелка – образуването на оптически празни пространства, поради разслояване на гладко-мускулните слоеве.

За разлика от останалите групи, при SHR със суплементация на селен:

- Ендотелът е сравнително запазен, въпреки че често проминира към лумена и част от ядрата на ендотелните клетки показват нагъвания.
- Не е честа картина, установяването на големи колагенови струпвания под ендотела, а напротив има леко натрупване на млад колаген, което отличава аортната стена на тези животни от другите 2 групи.
- Еластичните мембрани не показват различия в сравнение с другите експериментални групи животни. И тук показват участъци на задебеляване, в други изтъняват, контурът им се размива и в съседство се установяват междуклетъчни мостчета от еластин.
- Гладко-мускулните клетки показват различна степен на зрялост и функционално състояние. Прави впечатление наличието на повече млади форми клетки в тази група.



Фиг. 36. Репрезантативни фотомикрограми на светлинна и електронна микроскопия на аортна стена на плъхове SHR на 8месечна възраст на диета с високо съдържание на Se. Н&Е - тънката стрелка показва промените в ендотела, а дебелата – промени в медията. ЕМ – участък от медия; тънката стрелка показва наличие на млади гладко-мускулни клетки и оскъдно количество колаген, а дебелата стрелка – леко задебелена еластична мембрана.

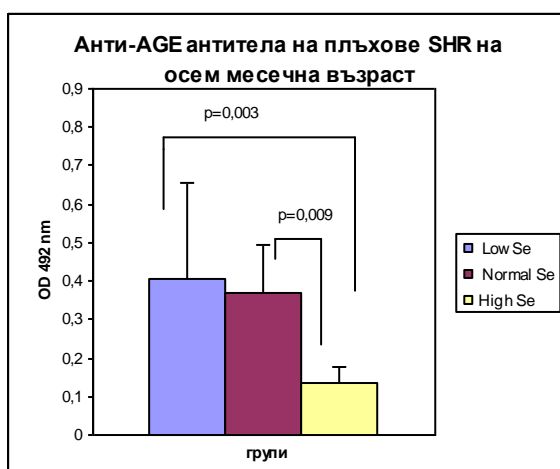
Налице са електронно-микроскопски данни, че ниско-селеновата диета води до значителни патологични промени в ултраструктурата на аортната стена, докато суплементацията със селен забавя развитието на дегенеративни промени.

8. Имунологични изследвания

Поради установените достоверни влияния на различния селенов прием върху имунологичните показатели на SHR животните на 4 месечна възраст, направихме такива изследвания само на тази порода на 8 месечна възраст.

8.1. Имунологични изследвания за антитела срещу късни продукти на гликирането (anti-AGE abs)

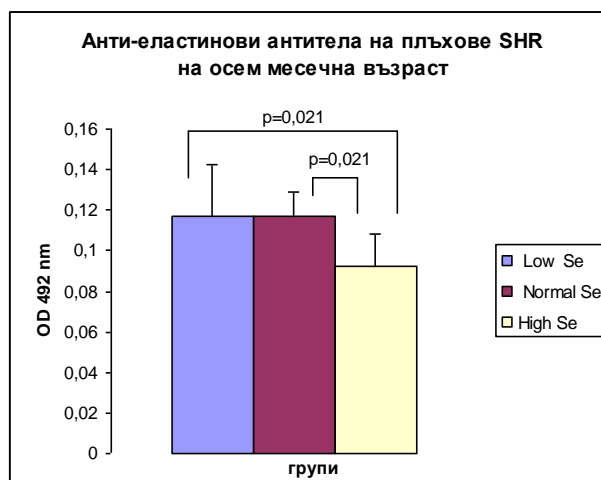
Селеновата суплементация значимо понижава серумното ниво на anti-AGE abs при SHR на 8 месечна възраст ($p < 0,05$) – вж. фиг. 37.



Фиг. 37. Серумни нива на anti-AGE abs при SHR на диета с различно съдържание на селен представени като $(\bar{X}) \pm SD, OD 492 \text{ nm}$.

8.2. Имунологични изследвания за анти-еластинови антитела (AE abs)

Плъховете SHR на 8 месечна възраст със селенова суплементация имат значимо по-ниско серумното ниво на anti-AE abs ($p=0,021$) – вж. фиг. 38.



Фиг. 38. Серумни нива на анти-еластинови антитела при SHR на диета с различно съдържание на селен представени като (X)±SD, OD 492 nm.

V. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Съдовият ендотел е динамична структура, имаща водещо значение за поддържане нормалните функции на сърдечно-съдовата система, чрез отделянето на вазоактивни субстанции. Балансът в продукцията на вазоконстриктори и вазодилататори е определящ за съдовия тонус.

Селенът е есенциален микроелемент, постъпващ в организма най-вече с храната и осъществяващ биологичното си действие като кофактор на селенопротеините, чиято експресия в тъканите зависи от дневния селенов прием. Глутатион пероксидазите и тиоредуксин редуктазите са основните селенопротеини, експресирани в ендотелните клетки. Те участват в регулацията на съдовия тонус, поддържайки баланса на супероксидните аниони и азотния оксид, регулирайки експресията на клетъчно-адхезивни молекули, клетъчната апоптоза, продукцията на ейкозаноиди, контролирайки активността на циклооксигеназите и липооксигеназите (Brigelius-Flohe et al., 2003). Допълнителен механизъм за повлияване функциите на сърдечно-съдовата система е чрез понижаване синтеза и активността на дейодиназите при селенов дефицит (De Lorgeril M. and Salen P., 2006).

Застрасени от селенов дефицит са хора, живеещи в райони, в които почвата е бедна на селен и пациенти на продължително тотално парентерално хранене. Публикувани са данни, че ниската серумната концентрация на Se при

хора асоциира обратно със сърдечно-съдовия риск (Flores-Mateo G. et al., 2006). Лонгитудинални проучвания на жители на Финландия сочат негативна връзка със серумната концентрация на Se и риска от развитие на нормално-високо кръвно налягане и хипертония при мъже (Nawrot et al., 2007).

Известно е, че повечето от обратимите фактори за развитие на ССЗ се повлияват от храненето, поради възможността за въздействие върху важни явления в сърдечно-съдовата система: липопротеиновата хомеостаза (отношението HDL- /LDL- холестерол); ендотелния и артериален интегритет, контрола върху тромбогенния потенциал, контрола върху нивата на хомоцистеина, контрола на артериалната хипертония.

Поради гореизложените факти си поставихме цел да направим проучване как различното селеново съдържание в храната повлиява състоянието на съдовата стена при нормо- и хипертензия.

За целта използвахме нормотензивни WKY плъхове и SHR, с генетично детерминирана хипертензия. Приложихме в продължение на 8 седмици 3 диети с различно съдържание на Se в два възрастови периода: 1. предпубертетен и пубертетен период (от края на 2^{ри} до края на 4^{ти} месец), когато сърдечно-съдовата система се поддава най-лесно на модулация, под външни въздействия; 2. период на зрялост (от края на 6^{ти} до края на 8^{ми} месец), когато имаме по-дълго въздействие на хипертензията върху съдовата стена на SHR.

С приложените три различни селенови диети сме успели да достигнем значими различия в **серумната концентрация на Se** при плъховете на 4 месечна възраст. На 8 месечна възраст, след прилагането на диетите също отчетохме повишаваща се серумната концентрация на Se, в зависимост от съдържанието на Se в храната. Значимо е понижена серумната концентрация на Se при WKY с нисък селенов прием, спрямо другите 2 групи, докато при SHR, селеновата суплементация е тази, която значимо я повишава в сравнение с другите 2 групи от същата порода. Тези различия от една страна може би се дължат на настъпващи с възрастта промени в метаболизма, а от друга страна на някои разлики в механизмите, участващи в поддържане на хомеостазата на различните породи плъхове.

Липидната пероксидация, която има автокаталитичен характер, дава невероятно разнообразие от токсични продукти и може да бъде ограничена от някои антиоксидантни ензими. Цитозолната GPx-1 е антиоксидантен ензим,

катализиращ редукцията на водородния и други органични пероксиди, имащ експресия във всички клетки на организма.

И в двата изследвани възрастови периода установихме, че нивото на липидна пероксидация при хипертензивните животни е по-високо от това на нормотензивните при контролните групи. При възрастните SHR установихме достоверна обратна значителна по сила връзка между серумната концентрация на ROOH и активността на GPx-1 в цялостна кръв ($r = -0,59$).

Пониженият прием на Se при WKY плъхове значимо повишава нивото на липидна пероксидация, а суплементацията със Se не оказва значимо влияние върху този процес. Прави впечатление, че при хипертензивните животните селеновата суплементация значимо снижава липидната пероксидация спрямо контролната група до ниво, близко на това, отчетено за контролната група на нормотензивните плъхове, вероятно поради подобрения антиоксидантен статус.

Селеновата суплементация повишава значимо **активността на ензима GPx-1 в цялостна кръв** и при двете породи плъхове на 4 месечна възраст. Установихме значителна по сила положителна корелационна връзка между активността на ензима GPx-1 в цялостна кръв (U/g Hb) от серумната концентрация на Se ($\mu\text{g/L}$) при плъховете на 4 месечна възраст: за WKY ($r = +0,65$) и за SHR ($r = +0,62$). Липсата на достоверни разлики в активността на ензима GPx-1 в цялостна кръв между групите с ниско и нормално съдържание на Se в диетата, вероятно се дължи на настъпващи преразпределителни промени в насищането на различните тъкани със Se при неговия понижен внос.

При WKY ниско-селеновата диета значимо понижава активността на GPx-1 в цялостна кръв на 8 месечна възраст, а суплементацията със Se не я променя съществено, спрямо тази на контролната група. При SHR на същата възраст селеновата суплементация значимо повишава активността на GPx-1 в цялостна кръв, а ниско-селеновата диета не я променя. Тези резултати са в унисон с определената серумна концентрация на Se в групите.

Резултатите за влиянието на различния селенов прием върху GPx-1 активност в цялостна кръв при двата възрастови периода имат различия, които биха могли да се обяснят както с достоверните разлики за серумната концентрация на Se между групите, така и със свързването му не само с GPx-1 на еритроцитите, но и със селенопротеин Р, който според съвременните

схващания е основният му транспортър до тъканите, нуждаещи се от по-добро насищане на вътреклетъчните селеноензими. Установено е, че разпределението на Se в серума на здрави лица е следното: $53 \pm 6\%$ е свързан със селенопротеин P; $39 \pm 6\%$ - като глутатион пероксидаза и $9 \pm 4\%$ - с албумин (Harrison et al., 1996). При хора ниският селенов прием, концентрацията на Se в плазмата и GPx активност имат положителна линейна връзка до прагова плазмена концентрация на Se от 70 до 100 $\mu\text{g/L}$, над която GPx активност остава на постоянно максимално ниво на насищане (Lynne Daniels, 2004). Селеновата суплементация повишава селенопротеиновата синтеза, поради повишени нива на Sec-tRNA, водещи до по-ефикасна селено-цистеинова инкорпорация. Установено е, че при диета с ниско селеново съдържание, GPx-1 и Sel P нива се понижават, като активността на GPx-1 е много по-намалена (Driscoll & Copeland, 2003).

Whanger and Butler през 1988г., изследвайки активността на GPx-1 при различни видове бозайници, установяват за плъхове на диета с нормално селеново съдържание (0,1 $\mu\text{g Se / g}$ храна), че 98% от активността на ензима GPx-1 в цялостна кръв ($528 \pm 20 \text{ U/g Hb}$) е за сметка на GPx-1 активност в еритроцитите ($518 \pm 21 \text{ U/g Hb}$). Същите автори намират, че активността на ензима е различна в различните органи: най-висока е в черен дроб, еритроцити, бял дроб и сърце.

Нашите резултати показват, че GPx-1 активност в цялостна кръв в границите на нормата на 4 месечна възраст имат само плъховете със суплементация на Se, като при WKY активността на GPx-1 се повишава с 25%, спрямо групата на диета с нормално селеново съдържание в храната, а при SHR – с 14%. При изследваните плъхове на 8 месечна възраст GPx-1 активност в цялостна кръв в границите на нормата имат групите със суплементация на Se от двете породи плъхове и WKY на диета с нормално селеново съдържание в храната. При WKY селеновата суплементация не повишава активността на ензима GPx-1, но ниският Se в диетата води до понижаване на активността му с 26%. При хипертензивните животни в тази възрастова група селеновата суплементация повишава активността на GPx-1 в цялостна кръв с 18%, докато ниско-селеновата диета не води до промяна. Тези резултати ни дават основание да направим предположение, че вероятно в условия на хипертензия, праговата плазмена концентрация на Se за достигане на максимална GPx-1

активност е завишена, поради необходимостта от по-мощна антиоксидантна съдова защита.

Много проучвания сочат, че антиоксидантните ензими GPx и SOD имат централна роля при обезвреждане на ROS в клетките, но GPx-1 активност е по-важният предиктор за кардиоваскуларни инциденти. Установена е негативна корелативна връзка между GPx активност и риска от сърдечни атаки. Направен е извод, че активността на GPx-1 в еритроцитите има прогностично значение за кардио-васкуларните заболявания, наред с традиционно-известните рискови фактори (Blankenberg et al., 2003).

Селен-съдържащият ензим GPx-1 има водещо значение за елиминиране на пероксиди в клетката. Водородният пероксид модулира различни аспекти на функцията на ендотелните клетки: растежа и пролиферацията им; апоптозата; ендотелно-зависимата вазодилатация; бариерната им функция; ендотелния възпалителен отговор; ендотелния контрол на съдовото remodelиране (Cai H., 2005; Faraci, 2006). Дефицитът на GPx-1 директно индуцира увеличение на оксидативния стрес, водещ до ендотелна дисфункция (Forgione et al., 2002).

Поради тези причини ние проучихме, каква е **експресията на ензима GPx-1 в аортна стена и миокард** на нормотензивни и хипертензивни плъхове, подложени на диети с различно съдържание на Se в различни периоди от своя жизнен цикъл.

От проведеното полу-количествено оценяване на експресията на GPx-1 чрез имунофлуоресцентен метод установихме, че тя е в пряка зависимост от съдържанието на Se в диетите, с които са третирани опитните животни и през двата възрастови периода. Суплементацията със Se води до повишена експресия на ензима в аортна стена и миокард, докато ниският Se в диетата води до ниска експресия на ензима. Резултатите показват, че в стената на аортата GPx-1 се експресира най-вече в ендотела и по-слабо в медията, но при плъховете със селенова суплементация не може да се направи категорична разлика в силата на имунофлуоресценция между ендотел и медия.

При имунохистохимично изследване на промените в експресията на антиоксидантни ензими в коронарни артерии на аутопсирани пациенти без атеросклеротични промени е отчетено, че експресията на GPx-1 е най-вече в ендотела и по-слаба в гладко-мускулните клетки (Kobayashi et al., 2002).

Резултатите ни за групите плъхове на диета с ниско и нормално съдържание на Se са еднопосочни, но се различават за групите със суплементация на Se, където имаме повишена експресия на GPx-1 и в медията на аортата.

Азотният оксид, който се синтезира от ендотела, оказва влияние върху тонуса на кръвоносните съдове и ендотелния интегритет, инхибира миграцията и пролиферацията на гладко-мускулните клетки. NO, синтезиран в кардиомиоцитите е отговорен за нормалния интегритет на миокарда и медиера, зависимата от разтягането, сила на миокардната контракция. В последните години нарастна интересът за изучаване значението на азотно-оксидната синтаза в кардио-васкуларната биология, поради нейното влияние върху контрола на вариабилността на кръвното налягане и модулацията на миокардното ремоделиране при ситуации на хемодинамично пренатоварване (Balligand, 2009). Поради тези причини ние изследвахме **експресията на ензима eNOS-3 в аортна стена и миокард.**

Резултатите, които получихме в нашия експеримент сочат, че при хипертензивните животни експресията на eNOS-3 в аортата е по-силно изразена, отколкото при нормотензивните. Различните селенови диети не променят значимо степента на експресия на eNOS-3 в аортата и в миокарда на WKY плъхове, но при SHR суплементацията със селен значимо понижава експресията на eNOS-3 в аортата.

Регулацията на eNOS-3 експресия е комплексна. Ензимът eNOS-3 обратимо се асоциира с различни фамилии протеинови партньори, регулиращи eNOS суб-целуларната локализация, каталитичната функция и биологичната активност. Множество екстрацелуларни стимули, чрез посттранслационни модификации динамично контролират функцията на eNOS-3 и NO биоактивност в съдовите стени. Повишената продукция на O_2^- може да понижи бионаличния NO и да повиши продукцията на H_2O_2 . Хронично повишеното артериално налягане повишава оксидативния стрес чрез повлияване на NAD(P)H-оксидазен път и активиране на локалната ренин-ангиотензинова система (Ungvari et al., 2004). При физиологични условия NO обикновено е в твърде ниски концентрации, за да може ефективно да конкурира SOD за супероксида, но при патологични условия той може да се разглежда като прооксидант.

Не са изяснени интимните механизми на увреждане на компартментализацията на eNOS-3 и би могло да се предположи че

цитозолната NOS-3, когато е некуплирана е отговорна за продукцията на H_2O_2 (Dudzinski and Michel, 2007). Установено е, че H_2O_2 понижава наличния L-arginine чрез стимулиране на аргиназата (Thengechaisri et al., 2006). Публикувани са данни, че пероксидите, продукт от действието на NAD(P)H оксидазите са мощен активатор на eNOS *in vivo* и са отговорни за повишените базални нива на NO и H_2O_2 у млади SHR (Zhou X. et al., 2008). Повишените нива на пероксилни радикали могат да инактивират NO, формирайки липидни пероксинитрити. Така дефицитът на GPx-1 активност, водеща до повишени ROS, понижава бионаличния NO, без да е понижена експресията на eNOS. Понижението на NO повишава експресията на eNOS на принципа на отрицателната обратна връзка.

Нашите резултати са подобни на тези, установени от други изследователи, които показват, че при SHR прилагането на антиоксидантна терапия с лазароид понижава експресията на eNOS и iNOS в съдовете, миокарда и бъбрека, където поради повишения оксидативен стрес е имало компенсаторно повишаване на експресията им, но при WKY няма този ефект (Vaziri et al., 2000). Експериментални данни с клетъчни култури от коронарни ендотелни клетки показват, че повишените нива на ROS повишават експресията на eNOS-3 (Zhen J et al., 2007).

Получените от нас резултати доказват, че промените в експресията на eNOS-3 в аортна стена и миокард, респективно в нивото на бионаличния NO са резултат от комплексното влияние на няколко фактора в нашия експеримент: серумна концентрация на Se; активност на GPx-1; липидна пероксидация и тензионен стрес.

Хранителният режим е важен фактор при осъществяване на контрол върху холестероловия метаболизъм и метаболизма на полиненаситените мастни киселини, а също и за повишаване на антиоксидантния потенциал на организма (Попов Б., 2006). Получените от нас резултати не установиха значими разлики между групите за **общ холестерол**, който е в границите на нормата за плъхове (1,3 - 2,1 mmol/L).

Нашият експеримент с прилагането на диети с различно селеново съдържание показва, че суплементацията със Se е фактор, повишаващ отношението HDL- /LDL- холестерол при хипертензивните плъхове, с различна давност на хипертонията и при нормотензивните плъхове в зряла възраст.

Обясненията на този факт можем да търсим, от една страна в по-доброто насищане на тъканите със Se (най-вече черния дроб) и повишената експресия на селеноензимите в тях, а така също и в инсулино-миметичното действие на селена върху обмяната на основните хранителни вещества – белтъци, масти и въглехидрати (Whanger and Butler ,1988; Stapleton S., 2000).

В основата на кардиоваскуларните заболявания са възникването и прогресията на атеросклеротичните стенози, с развитие на генерализирана исхемия с последващи тъканни и органни лезии. Нашето проучване отчете наличие на морфологични промени в стената на торакалната и абдоминална аорта и коронарни артерии, зависещи от възрастта, наличието на хипертензия и дневния селенов прием.

При плъхове WKY на 4 месечна възраст се забелязват **патологични хистологични промени в стената на аортата** на тези с ниско съдържание на Se в диетата - задебеляване на гладко-мускулния слой и неравност на ендотела, докато при нормално и високо-селеновата диета ендотелът и дебелината на гладко-мускулния слой са запазени.

При SHR на 4 месечна възраст с ниско съдържание на Se в диетата са налице: нарушена цялост на ендотела, липидни и калциеви отлагания субендотелно, пролиферация на гладко-мускулни клетки.

Ниското съдържание на Se в храната води до значимо задебеляване на стената на торакалната и абдоминалната аорта и при нормотензивните и при хипертензивните плъхове на 4 месечна възраст. Животните от тези групи показват наличие на дегенеративни промени, особено силно изразени при SHR.

Стената на торакалната аорта при SHR групи с нормално и високо съдържание на Se в храната на 4 месечна възраст е по-дебела, отколкото при WKY групи на същата диета, докато ниско-селеновата диета при WKY силно увеличава дебелината на торакалната аорта и я изравнява с тази на SHR LSe. Дебелината на абдоминалната аортна стена показва значими различия между групите WKY и SHR на еднаква селенова диета. Това вероятно се дължи на повишеното налягане, на което хронично е подложена съдовата стена при SHR.

Установихме умерена отрицателна връзка между дебелината на торакална и абдоминална аортна стена и серумна концентрация на Se при WKY плъхове на 4 месечна възраст ($r = -0,42$ и $r = -0,38$). При SHR животните

установихме значително силна отрицателна връзка между дебелина на аортна стена и серумна концентрация на Se на 4 месечна възраст ($r = -0,56$ и $r = -0,46$).

Установените в нашия експеримент връзки между дебелината на аортна стена и серумна концентрация на селен ни дават основание да заключим, че селенът е значим фактор за състоянието на съдовата стена в този възрастов период.

Хисто-морфологичното изследване на аортите при всички групи експериментални животни на 8 месечна възраст установи дегенеративни промени, които най-вероятно са възрастови. Те обаче показват различия в зависимост от степента на тензионния стрес, на който са подложени.

Дегенеративните процеси при SHR ангажират по-обширни участъци от аортната стена, в сравнение с WKY и водят до тежки фибро-склеротични изменения, деформиращи и стенозиращи лумена на аортата, които могат да предизвикат хронични исхемични усложнения. Особено силно са засегнати плъховете от група SHR с ниско селеново съдържание в диетата.

При животните със суплементация на селен и WKY и SHR на 8 месечна възраст са налице хистологични данни за забавяне и по-лека степен на проявление на дегенеративните процеси в стената на аортата.

Животните SHR със суплементация на селен на 8 месечна възраст имат значимо по-малка дебелина на лява коронарна артерия, докато при WKY плъхове на същата възраст на различни селенови диети няма значими разлики в дебелината на лява коронарна артерия.

Резултатите за намерените патологични хистологични промени в аортната стена на SHR кореспондират обратно с тези за серумна концентрация на Se и с активността на ензима GPx-1 и пряко със серумната концентрацията на ROOH.

Нашите резултати потвърждават изводи, публикувани от други автори, че реактивните метаболити на кислорода и продуктите на липидна пероксидация са водеща причина за увреждане на ендотела (Henning, 1988; Loscalzo, 2003). Дегенеративните промени в съдовите стени са съпътствани от дисфункция. Нарушен е балансът в производството на вазодилататори и вазоконстриктори, което е причина за нарушена перфузия на жизнено-важни органи. Акумулацията на колаген и фиброзирането на съдовата стена при хронична

вазоконстрикция води до хипертрофично ремоделиране на съдовата стена, при което медията проминава към лумена и съотношението медия/лумен се повишава. Гладко-мускулните клетки се реаранжират около намаления лумен на съда. В началото това ремоделиране на малките артерии може да се счита за адаптивно, но после се превръща в неадаптивно и компрометира функциите на органите, което е причина за усложненията от хипертензията (Intengan & Schiffrin, 2001).

Намерените промени в нашия експеримент показват, че засягането на съдовите стени започва от торакалната аорта към абдоминалната аорта и пропагира към артериите. Свръхпроизводството на ROS или недостатъчната активност на ендогенните антиоксидантни ензими са основни патогенетични механизми за развитието на индуцирани от хипертензията увреждания на прицелни органи. Публикувани са данни, че при физиологични условия ниската GPx активност може да се компенсира с приема на витамин С и витамин Е, но когато организмът е подложен на допълнителни стресови фактори, използването на селеновата суплементация е по-безопасно и ефективно за редуциране на прицелните органи увреждания (Zhou et al., 2006).

Проследихме и **електронно-микроскопските промени в аортна стена** на изследваните групи животни на различен селенов прием и установихме, че те потвърждават намерените от нас хистопатологични промени.

Налице са електронно-микроскопски данни, че ниско-селеновата диета води до значителни патологични промени в ултраструктурата на аортната стена при 8 месечните плъхове и от двете породи, докато суплементацията със селен забавя развитието на дегенеративните промени.

Свръхпродукцията на абнормен колаген или намаленото количество на еластин допринасят за увеличение на артериалната ригидност. Нормално еластичните качества на кондютивните артерии се променят по хода на артериалното дърво: по-еластични проксимални съдове и по-ригидни дистални артерии. Публикувани са данни, че ендотелната дисфункция допринася значимо за повишение на артериалната ригидност у пациенти с изолирана систолна хипертония и при стареене (Sharon M. L. et al., 2007).

Еластинът и колагенът са основните протеини на екстрацелуларния матрикс (ECM) в съдовите стени. Проведените в нашия експеримент

електронно-микроскопски проучвания показват, че има промени в тяхното производство, свързани с възрастта и приложението на диети с различно селеново съдържание. Поради тази причина ние решихме да използваме **имунологични изследвания**, които да ни дадат отговор как е повлиян техният метаболизъм от различния селенов прием.

Гликирането на колагена и други дългоживеещи структурни протеини в съдовата стена ускорява развитието на съдови усложнения, защото понижава тяхната възможност за разграждане и води до ендотелна дисфункция, възпаление и оксидативен стрес. Неензимното гликиране на тъканните протеини е един от основните пътища за посттранслационни модификации. Свръхнатрупването на късни продукти на гликирането (Advanced Glycation End Products – AGEs) променя структурата и функцията на протеините и има роля в имуногенезата. Гликираните протеини формират общи имунологични епитопи, което увеличава образуването на антитела срещу тях (anti-AGE abs). Процеси на модификация, дължаща се на неензимно гликиране на дългоживеещи белтъци протичат, макар и по-бавно при физиологични условия, но тя е характерна най-вече за патогенезата на диабета и някои съдови заболявания. При нарушения в глюкозния и липиден метаболизъм се повишава продукцията на алдехиди, включващи глиоксал и метилглиоксал, които реагират неензимно със свободни аминок- и сулфхидрилни (SH-) групи на протеините и формират стабилни конюгати (Vasdev et al. 2007).

Свръхпроизводството на AGEs води до тъканни увреди чрез различни механизми, включващи нарушена структура и функция на тъканни протеини, стимулиране на клетъчни отговори чрез AGEs специфични рецептори или генерация на ROS. От друга страна оксидативният стрес усилва формирането на AGEs. В контрола на оксидативния стрес участват антиоксидантните ензими GPx и GRD, които имат SH- и аминок- групи на каталитичните си места. Директната модификация на тези групи от алдехиди при формиране на AGEs или реакция с AGE-модифицирани протеини може да инхибира активността на тези ензими, водещо до повишен оксидативен стрес. Натрупването на AGEs в съдовия матрикс повлиява бионаличността на NO, който е важен регулатор на съдовия тонус и гладко-мускулния интегритет. От една страна оксидирането на кофактора тетрахидробиоптерин на ензима eNOS, който е SH- зависим ензим понижава продукцията на NO, а от друга страна води до инактивация на вече

произведения NO, чрез взаимодействието на NO-радикал с други свободни радикали, формирани в реакциите на неензимно гликиране. AGEs стимулират производството на Ang II, чрез повишаване активността на ангиотензин конвертиращия ензим, а също така AGEs индуцират експресията на вазоконстриктора ендотелин-1, променяйки по този начин ендотелната функция в посока на вазоконстрикция (Potenza Maria A. et al., 2005). Освен това активирането на AGEs-рецептори от AGEs довежда до, медирано от NAD(P)H оксидазата, повишение на интрацелуларни ROS, екстрацелуларен H_2O_2 и експресията на VCAM-1 в човешки ендотелни клетки. Предишни проучвания показват, че AGEs иницира оксидацията на LDL. Взаимодействието на AGEs с компонентите на съдовата стена повишава техния пермеабилитет, експресията на прокоагулантна активност и генерирането на ROS, в резултат на което се получава ендотелна дисфункция, възпаление и повишен оксидативен стрес (Basta G. et al., 2004; Esper R.J. et al., 2008).

Засиленото неензимно гликиране и/или гликооксидация на дълго живеещите протеини в големите съдове и миокарда понижава еластичността им. Аортата става ригидна, което води до систолна хипертония и евентуална сърдечна недостатъчност (Vasdev S. et al., 2006). AGEs акумулират в атеросклеротичните плаки на аортата, като концентрацията им е свързана с ригидността на артериалните стени при хипертензивни пациенти. Серумната концентрация на AGEs положително корелира с дебелина intima-media на каротидните артерии, възпалението на каротидните плаки и възможността им за руптура (Vaziri Nosratola D., 2008). При хипертония и стареене, когато неензимното гликиране на протеините нараства и те акумулират в съдовата стена имаме стимулиране производството на анти-AGE abs.

От казаното до тук е ясно, че AGEs и ROS променят про-оксидантния статус, и водят до промени, които са характерни за хипертонията и атеросклерозата. Според някои изследователи прилагането на антиоксиданти би могло да модулира тези промени (Lewis P. et al., 2007; Vasdev S. et al. 2007).

Резултатите от нашия експеримент сочат, че селеновата суплементация не променя съществено нивото на анти-AGE антителата при WKY плъхове на 4 месечна възраст, но ниското съдържание на Se в диетата води до значимото им повишение, вероятно поради влошения антиоксидантен статус.

При сравняване на групите SHR на различни селенови диети и при двата възрастови периода се установи, че тези на диетата с повишено селеново съдържание имат значимо по-ниско ниво на анти-AGE антитела, вероятно поради редуцирания оксидативен стрес.

Хипертрофията на артериите в резултат на хипертензията се дължи на промени в съединително-тъканните протеини колаген и еластин. Значителните **промени в еластиновия метаболизъм** водят до нарушен интегритет на богати с еластин органи, като кръвоносни съдове, бял дроб, кожа, мускули.

Еластинът като основен екстрацелуларен компонент на съединителната тъкан е отговорен за еластичността на големите съдове. Съвременните изследвания доказват, че обмяната на еластина съществува и в зрелия организъм (Robert L. et al., 1995). Антигенната структура на еластина претърпява не само физиологични промени, но се променя и при патологични процеси в съдовата стена.

Анти-еластиновите антитела, физиологично свързани с деградационните продукти от обмяната на еластина, навлизат в циркулацията чрез моноцито-макрофагеалната система. Повишеното им серумно ниво говори за променени или остарели еластинови структури на съдовата система, т.е. за повишени разградни продукти на еластина (Baydanoff et al., 1987; Colburn et al., 1995). Антителата разпознаващи прекурсора на еластина – тропоеластин са маркер за еластиновия синтез. При здрави индивиди АТЕ abs и АЕ abs са част от хомеостатичния механизъм, който дава представа за синтез на нови еластинови структури или почистване на организма от увредени еластинови структури. Този механизъм може да бъде нарушен при хипертензия или понижена активност на антиоксидантни ензими.

Проучвания при SHR сочат, че биосинтезата на колаген и еластин в аортната стена надвишава тази при WKY в пред-хипертензивния период (до 4-та седмица от раждането), понижена е във възрастта от 14 до 16 седмици (развитието на хипертензията) и отново е по-висока след 16-та седмица. Публикувани са данни, че това второ повишение в синтеза на основните протеини на ЕСМ може да бъде избегнато в зависимост от избора на антихипертензивна терапия, повлияваща ензимите участващи в метаболизма им (Tsoporis et al., 1998; Han WQ et al., 2009). Нормално скоростта на синтез и

разграждане на еластина и колагена в артериите е ниска, но при съдова патология се засягат регулаторните механизми, които поддържат този баланс в метаболизма им. Повишената експресия на проинфламаторни и протеазно-инхибиторни молекули, в отговор на хипертензията, значително повишава синтеза на протеините на ECM. В същото време нараства разграждането на еластина и еластиновите влакна от дисбаланса между ензимните системи на анти-протеази и протеази (еластази), (Arribas S. et al., 2006; Jacob M., 2003). Ефектът на хипертензията върху еластиновите влакна води до тяхното изтощение и повишава разграждане им, което е причина за загуба на еластичността на артериалните съдове. Освен това еластин-деградационните продукти могат да действат като сигнални трансдюсери и да регулират клетъчната пролиферация и миграция. По този начин повишеното ниво на разградни продукти от протеините на ECM ни дава представа за прогресията на хипертензията.

Нашите резултати показват, че при SHR на 4 и 8 месечна възраст серумното ниво на AE abs при групата със селенова суплементация е значимо по-ниско. Установихме умерена положителна връзка между дебелина на аортна стена и серумно ниво на анти- α - еластиновите антитела при SHR на 4 месечна възраст ($r = +0,35$).

Нивото на анти-тропоеластините антитела при WKY плъховете беше по-високо в сравнение с SHR на еднакви селенови диети, но достоверна разлика бе отчетена само за групите с ниско съдържание на Se в диетата.

Отношението между ATE abs и AE abs, даващо ни представа за отношението между процесите на синтез и разграждане на еластина бе достоверно повишено при SHR със селенова суплементация, докато при WKY плъхове диетата с нормално съдържание на Se има анаболен ефект върху еластиновия метаболизъм.

Регресията на артериалната хипертрофия зависи от специфичното третиране с антихипертензивни медикаменти. При SHR е установено наличие на повишени протеази в кръвта (DeLano F. and Schmid-Schonbein Green, 2008). Възможно е селеновата суплементация, подобрявайки редукционния статус при SHR, да води до понижение на еластиновото разграждане чрез понижение на еластазната активност (Tsoporis, 1998).

При животински модели е показано, че абнормното редокс-състояние на артериалната стена при хипертония и атеросклероза има определящо значение за нарушения контрол на вазомоторния тонус (Zhou X. et al., 2008).

Систоличното артериално налягане при нормотензивните животни не се промени съществено от приложените диети с различно селеново съдържание, докато при SHR ниското съдържание на Se в диетата доведе до задълбочаване тежестта на хипертонията. Причините за това са настъпилите тежки морфологични промени в съдовата стена, в метаболизма на белтъците на съединително-тъканния матрикс и оксидативния баланс.

В **заклучение** можем да кажем, че различното съдържание на селен в храната води до промени във функционалното състояние на съдовите стени и при нормотензивните и при хипертензивните плъхове.

Ниският селенов прием влошава антиоксидантния статус, води до дегенеративни промени и задебеляване на аортната стена и при WKY и при SHR експериментални животни, което е предпоставка за нарушаване перфузията на жизнено-важни органи.

Повишеният селенов прием не оказва значимо влияние върху функционалното състояние на съдовата стена при нормотензивните плъхове в млада възраст. При възрастните животни обаче, подобрявайки редуцирания статус забавя настъпването на дегенеративни промени в съдовете и увеличава индекса HDL- /LDL- холестерол.

Резултатите от нашите изследвания сочат, че селеновата суплементация има позитивен ефект при SHR и в млада и в зряла възраст по отношение на антиоксидантния статус, липидната обмяна, еластиновия синтез и забавя развитието на патологичните морфологични промени в аортна стена и коронарни артерии.

VI. ИЗВОДИ

1. Използваните от нас три диети с различно съдържание на селен, приложени в млада и зряла възраст водят до достоверни разлики в серумната концентрация на селен и при WKY и при SHR групите.
2. Хипертензивните плъхове от контролните групи на диета с препоръчително съдържание на селен в храната имат значимо по-високо ниво на липидна пероксидация, по-високо серумно ниво на антитела срещу късни продукти на гликирането и анти-еластинови антитела, по-дебели стени на аортата и по-силно изразена експресия на eNOS-3 в тях, в сравнение с контролните групи на WKY. При възрастните SHR активността на GPx-1 в цялостна кръв е по-ниска отколкото при WKY.
3. Ниският селенов прием предизвиква тежки дегенеративни промени в аортната стена още в млада възраст и при двете породи плъхове и значимо повишава САН при SHR.
 - При възрастните WKY понижава активността на GPx-1 в цялостна кръв.
 - Понижава експресията на GPx-1 в аортна стена и миокард, повишава се нивото на липидна пероксидация, антителата срещу късни продукти на гликирането и анти-еластиновите антитела и в двата възрастови периода.
4. При SHR селеновата суплементация повишава активността на GPx-1 в цялостна кръв и експресията ѝ в аортна стена и миокард и понижава степента на експресия на eNOS-3 в аортите, понижава нивото на липидна пероксидация, повишава отношението HDL-/LDL- холестерол, понижава антителата срещу късни продукти на гликирането и анти-еластиновите антитела.
5. Налице са хистологични и електронно-микроскопски данни, че дегенеративните процеси в съдовете започват от торакалната аорта и се разпространяват към абдоминалната аорта, като са по-изразени и ангажират по-обширни участъци при SHR.
 - Ниското съдържание на селен в храната води до значимо задебеляване на аортната стена както при нормотензивните така и при хипертензивните плъхове.

- Селеновата суплементация забавя процеса на развитие и разпространение на дегенеративните процеси в абдоминална аорта и коронарни артерии при SHR.

VII. ПРЕПОРЪКИ

Получените в нашия експеримент данни внушават необходимостта от изготвянето на проекти за разширени клинични проучвания в следните насоки:

1. За ефекта на селеновата суплементация при пациенти със сърдечно-съдови заболявания, за да бъдат събрани достатъчно доказателства за полезното ѝ влияние, което би позволило широкото ѝ използване в лечението на тези болни, успоредно с традиционната медикаментозна терапия.

2. Имайки предвид получените резултати за патологичния ефект на ниския селенов прием върху антиоксидантния статус и състоянието на съдовите стени, би било полезно да се направят нови обширни проучвания по отношение на селеновия хранителен статус на населението, обитаващо територии с бедни на селен почви, в частност и в България.

3. Клиничните проучвания биха помогнали да се прецизира в каква доза, колко дълго и при кои рискови групи да се прилага превантивна суплементация със селен, за да бъде оценено достатъчно категорично съотношението полза/риск от прилагането ѝ, поради наличието на публикувани противоречиви данни по този въпрос.

VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

A. Приноси с оригинален характер

1. За първи път у нас е използван и проучен тристепенен модел на селеново ниво – ниско, нормално и завишено и са оценени съвместно оксидативният статус, промените в артериалното налягане, липидният профил и функционално-морфологичното състояние на аортата у нормо- и хипертензивни плъхове от две възрастови групи – млада (4 месечни) и зряла (8 месечни).
2. Допълнени са данните за ролята на селена и свързаните с него селенопротеини с ненаблюдаван до момента, нов физиологичен факт при нормо- и хипертензивни плъхове:
 - Нормотензивните WKY плъхове са по-зависими от селеновия дефицит, докато хипертензивните SHR показват по-висока чувствителност към селенова суплементация.
 - Този факт предполага наличието на разлики в регулацията на селеновия метаболизъм при двете групи плъхове, които изискват допълнителни изследвания.
3. Наблюдавани са и нови ефекти в условия на различен селенов внос:
 - Дефицитът на селен завишава, а суплементацията му занижава анти- AGE антителата в условията на експеримент.
 - Селеновата добавка подобрява отношението синтез/деструкция на еластина в аортната стена при хипертензия.

Б. Приноси с потвърдителен характер

4. Убедително се подкрепят данните за:
 - Потенцирания оксидативен стрес в аортната съдова стена в условия на артериална хипертензия.
 - Ролята на селена като екзогенен антиоксидант, реализиращ антиоксидантната си защита главно чрез експресия на глутатион пероксидазите.

IX. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЯВИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Списък на публикациите, свързани с дисертационния труд:

В България:

1. **Русева Б.**, Д. Страшимиров, Н. Шумков, Цв. Георгиева, А. Михайлова. Промени в липиден профил и аортна стена у плъхове на диета с различно селеново съдържание, Trakia Journal of Sciences, 2008, Vol. 6, N2, 86-89
2. **Boryana K. Ruseva**, Reny I. Tzvetkova, Yordanka S. Martinova, Margarita V. Mollova, Margarita L. Alexandrova, Tzvetan H. Lukanov . Determination of glutathione peroxidase expression in aortic wall of spontaneously hypertensive rats under diet of different selenium content, Journal of Biomedical and Clinical Research, MU – Pleven, Vol.1, N1, 2008, 26-29
3. **Ruseva B. K.**, Strashimirov D., Shumkov N., Georgieva Tzv., Mihailova A. Changes of lipid profile and aortic wall in spontaneously hypertensive rats under diet of different selenium content, Scientific Research Journal of South-West University, October 2008, 1 (1): 101-104
4. **Боряна Русева**. Селен и съдова стена, Наука Диететика, изд. „Арбилис”, София, год. III, 2011, 1, 16-20

В чужбина:

5. **Boryana Ruseva**, Miglena Georgieva, Milena Atanasova, Margarita Alexandrova, Pavlina Laleva. Effects of selenium supplementation on lipid peroxidation and serum antibodies against advanced glycation end products in spontaneously hypertensive rats, Official Journal of the Balkan Medical Union – Archives of BMU, Bucharest, Romania, 2011, 2, 138-141

Списък на съобщенията в научни сесии и конгреси, свързани с дисертационния труд:

В България:

1. **Boryana Ruseva**, Milena Atanasova, Miglena Georgieva, Anelia Dimitrova, Nikolay Shumkov, Denko Strashimirov. Determination of anti-elastin antibodies and thickness of vessel wall of spontaneously hypertensive rats under varying selenium diets, Third workshop on biological activity of metals and metal compounds, November 19 -20, 2008, BAS, Sofia, Abstracts book, p. 33-34
2. **Ruseva B.K.**, Alexandrova M. L., Laleva P. A., Dimitrova A. A., Nikolov V.Ts. Effect of selenium supplementation on lipid peroxidation in spontaneously hypertensive rats, VIth National congress of pharmacology, Varna, Golden Sands, 1-4 October 2009, Suppl. at Autonomic & Autacoid Pharmacology, 2010, 30, 1-66:48
3. **B. Ruseva**, T. Betova, M. Alexandrova, A. Dimitrova, P. Laleva, V. Nikolov. Effects of selenium supplementation on the serum lipid peroxidation level and eNOS-3 expression in aorta and myocardium of spontaneously hypertensive rats, Fourth workshop on biological activity of metals and metal compounds, November 24 -25, 2009, BAS, Sofia, Abstracts book, p. 56-57
4. **Б. Русева**, Р. Иванова, М. Моллова, К. Цачев, А. Димитрова. Влияние на различния селенов прием върху промените в аортна стена на млади нормотензивни плъхове, IX^{ти} Национален конгрес по хранене с международно участие „Науката за хранене между дискусиите и доказателствата“, МДУ „Фр. Ж. Кюри“, КК „Св. Константин и Елена“, Варна, 19-22 май 2011г., Сборник резюмета, стр. 175

В чужбина:

5. **B. Ruseva**, A. Dimitrova, R. Ivanova, K. Tzatchev, M. Atanasova. Influence of different selenium intake on elastin turnover in spontaneously hypertensive rats, The Sixth European Elastin Meeting, June 28 – July 2, 2010, Maratea, Italy, Abstracts book, p. 64

X. SUMMARY

The interest on the participation of the free radical processes in physiology and pathophysiology of the organism increases in the last decades of years. Knowledge on the mechanisms of production and reduction of reactive oxygen species (ROS) and factors that may control and modify them will allow the founding of new more efficient modes for prevention and treatment of diseases in pathogenesis they participate. Selenium (Se) is a trace element that performs its biological role mainly as cofactor of enzymes that take action in the antioxidant defense of the organism, in the redox systems and in the metabolism of thyroid hormones. Expression of selenoproteins depends on daily Se intake.

The endothelium of the vessels is a dynamic structure that maintains normal functions of cardiovascular system by the production of vasoactive substances. The balance between production of vasoconstrictors and vasodilators is important in the control of the vessel tone. The glutathione peroxidases (GPx) and thioredoxine reductases are the main selenoproteins, expressed in the endothelial cells. ROS and the products of lipid peroxidation are the main cause for injury of endothelium. GPx-1 is an antioxidant enzyme that catalyzes reduction of the hydrogen hydroperoxide and the other organic hydroperoxides. The deficit of GPx-1 may induce the increase of oxidative stress, leading to endothelial dysfunction.

The aim of this study is to investigate the effects of the different Se intake on oxidative status and their impact to the lipid profile and the state of the vessel wall in normotensive Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats (SHR).

The different selenium content diets (low, adequate and high) were applied for 8 weeks on the experimental rats in two periods of their life (pubertal and adult).

Our results showed that the low Se intake worsens antioxidant status and leads to severe degenerative changes and thickening of the aortic wall of WKY and SHR that may be a prerequisite for disturbance of the perfusion of the important organs. Increased Se intake did not cause significant influence on the state of the vessel walls in young WKY, but in adults it slowed down the development of the degenerative changes in the aortic wall and increased index HDL- /LDL- cholesterol by improvement of redox state. Selenium supplementation had a positive effect on SHR in both investigated periods on the antioxidant status, on the lipid metabolism, on the elastin synthesis and slowed down the development of the pathological processes in the aortic wall and the coronary arteries. In conclusion we speculate that normotensive rats are more sensitive to Se deficit, whereas hypertensive rats are more sensitive to Se supplementation.

The presented study suggests an idea for the implementation of more clinical investigations on the use of selenium supplementation in treatment and prevention of cardiovascular diseases.